

ZUM NACHWEIS VON STAPHYLOKOKKEN-ENTERO-
TOXINEN AM MODELL DES TYP C₁
MIT DEM SANDWICH-ELISA

HERMANN SCHREINER

*Diss.
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554828_0010

AUS DEM INSTITUT FÜR HYGIENE UND TECHNOLOGIE
DER LEBENSMITTEL TIERISCHEN URSPRUNGS
(LEHRSTUHL: PROF. DR. G. TERPLAN)
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

ZUM NACHWEIS VON STAPHYLOKOKKEN-ENTERO-
TOXINEN AM MODELL DES TYP C_1 MIT DEM SANDWICH-
ELISA

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER TIERMEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VON

HERMANN SCHREINER

AUS

PÖTTMES

MÜNCHEN 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. J. Meyer

Tag der Promotion: 26. Juli 1985

1	Einleitung	1
2	1.1 Zielsetzung	2
3	1.2 Methodik	3
4	1.3 Aufbau des Dokuments	4
5	2.1 Grundlagen	5
6	2.2 Projektziele und -ergebnisse	6
7	2.3 Projektorganisation und Teamstruktur	7
8	2.4 Projektbudget und Finanzierung	8
9	2.5 Projektrisikoprüfung	9
10	2.6 Projektabschluss	10
11	3.1 Projektziele und -ergebnisse	11
12	3.2 Projektorganisation und Teamstruktur	12
13	3.3 Projektbudget und Finanzierung	13
14	3.4 Projektabschluss	14
15	4.1 Projektziele und -ergebnisse	15
16	4.2 Projektorganisation und Teamstruktur	16
17	4.3 Projektbudget und Finanzierung	17
18	4.4 Projektabschluss	18
19	5.1 Projektziele und -ergebnisse	19
20	5.2 Projektorganisation und Teamstruktur	20
21	5.3 Projektbudget und Finanzierung	21
22	5.4 Projektabschluss	22
23	6.1 Projektziele und -ergebnisse	23
24	6.2 Projektorganisation und Teamstruktur	24
25	6.3 Projektbudget und Finanzierung	25
26	6.4 Projektabschluss	26
27	7.1 Projektziele und -ergebnisse	27
28	7.2 Projektorganisation und Teamstruktur	28
29	7.3 Projektbudget und Finanzierung	29
30	7.4 Projektabschluss	30
31	8.1 Projektziele und -ergebnisse	31
32	8.2 Projektorganisation und Teamstruktur	32
33	8.3 Projektbudget und Finanzierung	33
34	8.4 Projektabschluss	34
35	9.1 Projektziele und -ergebnisse	35
36	9.2 Projektorganisation und Teamstruktur	36
37	9.3 Projektbudget und Finanzierung	37
38	9.4 Projektabschluss	38
39	10.1 Projektziele und -ergebnisse	39
40	10.2 Projektorganisation und Teamstruktur	40
41	10.3 Projektbudget und Finanzierung	41
42	10.4 Projektabschluss	42
43	11.1 Projektziele und -ergebnisse	43
44	11.2 Projektorganisation und Teamstruktur	44
45	11.3 Projektbudget und Finanzierung	45
46	11.4 Projektabschluss	46
47	12.1 Projektziele und -ergebnisse	47
48	12.2 Projektorganisation und Teamstruktur	48
49	12.3 Projektbudget und Finanzierung	49
50	12.4 Projektabschluss	50

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	1
2 SCHRIFTTUM	2
2.1 Staphylokokken-Enterotoxin C	2
2.1.1 Allgemeines	2
2.1.2 Produktion und Reinigung	4
2.1.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften	8
2.1.4 Antigene Eigenschaften	14
2.1.5 Toxische Eigenschaften	18
2.2 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln mittels serologischer Methoden	20
2.2.1 Allgemeines	20
2.2.2 Enzymimmunmethoden	22
2.2.2.1 Allgemeines	22
2.2.2.2 Nachweis von SE in Lebensmitteln	23
2.2.2.3 Interferenzen durch Staphylokokken-Protein A (SPA)	31
3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN	36
3.1 Immunisierung von Kaninchen mit SEC ₁ und Aufbereitung der Antiserums	36
3.1.1 Material	36
3.1.2 Methodik	37
3.1.3 Ergebnisse	38
3.2 Enzymmarkierung von Anti-SEC ₁ -Kaninchen- Immunglobulin	38

	Seite
3.2.1	Material 38
3.2.2	Methodik 39
3.2.3	Ergebnisse 41
3.3	Nachweis von SEC mittels Sandwich-ELISA 43
3.3.1	Material 43
3.3.2	Herstellung des Immunosorbens 44
3.3.2.1	Methodik 44
3.3.2.2	Ergebnisse 46
3.3.3	Ermittlung der optimalen Konjugatverdünnung 48
3.3.3.1	Methodik 48
3.3.3.2	Ergebnisse 48
3.3.4	Optimierung der Enzymbestimmung 50
3.3.4.1	Methodik 50
3.3.4.2	Ergebnisse 52
3.3.5	Standardisierung 52
3.3.5.1	Methodik 52
3.3.5.2	Ergebnisse 54
3.3.6	Untersuchungen zur Spezifität 54
3.3.6.1	Methodik 54
3.3.6.2	Ergebnisse 56
3.4	Beeinträchtigungen des SEC ₁ -Nachweises durch Staphylokokken-Protein A und Möglichkeiten zu deren Eliminierung 57
3.4.1	Material 57
3.4.2	Reaktion von SPA mit Anti-SEC ₁ - γ -Globulin im Sandwich-ELISA 58
3.4.2.1	Methodik 58
3.4.2.2	Ergebnisse 58
3.4.3	Reaktion von SPA mit Kaninchen-IgG und Schaf-IgG im Sandwich-ELISA 60

	Seite
3.4.3.1	Methodik 60
3.4.3.2	Ergebnisse 61
3.4.4	Reaktion von SPA mit dem Untersuchungsmaterial zugesetztem Kaninchen- γ -Globulin 63
3.4.4.1	Methodik 63
3.4.4.2	Ergebnisse 64
3.4.5	Reaktion von SPA mit Anti-SEC ₁ -F(ab') ₂ - Fragmenten im Sandwich-ELISA 66
3.4.5.1	Methodik 66
3.4.5.2	Ergebnisse 68
3.5	Nachweis von SEC ₁ mittels Sandwich-ELISA in Kulturüberständen und Lebensmitteln 68
3.5.1	Material 68
3.5.2	Untersuchung von Staphylokokkus aureus-Kultur- überständen 71
3.5.2.1	Methodik 71
3.5.2.2	Ergebnisse 71
3.5.3	Untersuchung von mit SEC ₁ künstlich kontami- nierten Lebensmitteln 73
3.5.3.1	Methodik 73
3.5.3.2	Ergebnisse 74
3.5.4	Untersuchung von mit SEC ₁ -bildenden Staphylo- kokken beimpften Lebensmitteln 77
3.5.4.1	Methodik 77
3.5.4.2	Ergebnisse 78
3.6	Untersuchungen zur Stabilität von Immunosorbens und Konjugat 79
3.6.1	Material 79
3.6.2	Lagerungsfähigkeit des Immunosorbens 79

		Seite
3.6.2.1	Methodik	79
3.6.2.2	Ergebnisse	81
3.6.3	Stabilität des Konjugates	86
3.6.3.1	Methodik	86
3.6.3.2	Ergebnisse	86
4	DISKUSSION	87
5	ZUSAMMENFASSUNG	103
	SUMMARY	105
6	LITERATUR	107

1 EINLEITUNG

Staphylokokken-Intoxikationen zählen zu den häufigsten mikrobiell bedingten Lebensmittelvergiftungen, die durch hitzestabile Staphylokokken-Enterotoxine (SE) ausgelöst werden. Der Nachweis dieser Toxine ist aus epidemiologischen Gründen wichtig und dient außerdem dazu, die Erfahrungen hinsichtlich der Prophylaxe der Lebensmittelvergiftung zu vermehren.

Von einem dafür geeigneten Test wird eine Nachweisempfindlichkeit von 100 ng Enterotoxin in 100 g (festes) bzw. 250 ml (flüssiges) Lebensmittel gefordert. Mit dem konventionellen, unter die AOAC-Methoden aufgenommenen Gelpräzipitationstest nach OUCHTERLONY läßt sich aufgrund der verhältnismäßig geringen Sensitivität diese Forderung nur erfüllen, sofern die Lebensmittelprobe mit einem zeitaufwendigen Verfahren (Extraktion, Reinigung, Konzentration) aufbereitet wird. Von den mittlerweile entwickelten Methoden zum Nachweis von SE in Lebensmitteln sind die enzymimmunologischen Tests (EIA) offensichtlich am besten geeignet. Sie vereinen die Vorteile des Radioimmunoassay mit einer einfachen Handhabung und langen Haltbarkeit der Reagenzien.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein empfindliches enzymimmunologisches Verfahren nach dem Sandwich-Prinzip für den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin C entwickelt und auf seine Eignung zur Untersuchung von gereinigten SE-Präparationen, Kulturfiltraten und Lebensmitteln geprüft werden. Bei der Aufbereitung der Lebensmittel sollte auf Extraktions- und Konzentrierungsschritte soweit als möglich verzichtet und die Auswertung des Tests durch Einsatz eines Rechners erleichtert werden.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Staphylokokken-Enterotoxin C

2.1.1 Allgemeines

Die von etwa 50 % (NOTERMANS et al., 1984a) der koagulasepositiven Staphylokokken gebildeten Staphylokokken-Enterotoxine (SE) werden aufgrund ihrer Reaktion mit spezifischen Antikörpern klassifiziert und in alphabetischer Reihenfolge benannt (CASMAN et al., 1963). Bisher sind die SE-Typen A bis E isoliert worden, das von BERGDOLL et al. (1981) als Typ F bezeichnete Stoffwechselprodukt ist jedoch offenbar kein SE (REISER et al., 1983; IGARASHI et al., 1984) und trägt daher aufgrund einer internationalen Übereinkunft den Namen "Toxic Shock Syndrome Toxin One - TSST-1" (BERGDOLL und SCHLIEVERT, 1984).

BERGDOLL et al. identifizierten 1965 ein von den *Staphylococcus* (S.) aureus-Stämmen 137 und 361 des Food Research Institute Chicago (FRI) produziertes Enterotoxin, das sich in seiner antigenen Struktur von den bis dahin bekannten Typen A und B unterschied, und bezeichneten es als SEC. Der FRI-Stamm 137 war im Jahr 1933 aus Abszeßmaterial isoliert worden, der FRI-Stamm 361 im Jahr 1962 aus gekochtem Huhn, das Ursache einer Lebensmittelvergiftung war. Anschließend differenzierte man zwischen dem von Stamm 137 (ATCC 19095) gebildeten SEC₁ (BORJA und BERGDOLL, 1967) und dem vom Stamm 361 produzierten SEC₂ (AVENA und BERGDOLL, 1967) - zwei in ihren Eigenschaften sehr ähnliche, aber nicht identische Varianten. Erst vor einigen Jahren wurde die Existenz einer dritten Variante - SEC₃ - von REISER und BERGDOLL (1979) beschrieben. Dieses wird von einem ursprünglich in Großbritannien aus Garnelen isolierten S. aureus-Stamm (FRI-913) neben SEA, SEE und TSST-1 produziert; S. aureus FRI-1230 soll nur SEC₃-Bildner sein (REISER et al., 1984). SEC wird außer von aus menschlichem und tierischem Material isolierten S. aureus-Stämmen auch von S. intermedius (HAJEK, 1976) produziert.

Dabei fällt auf, daß ein erheblicher Anteil der enterotoxinogenen *S. intermedius*- (KATO et al., 1978; KAJI und KATO, 1980; ADESIYUN und USMAN, 1983; FUKUDA et al., 1984) bzw. ovinen *S. aureus*-Stämme (HAJEK und MARSALEK, 1973; RICHTER et al., 1977; HAJEK, 1978; MEYER et al., 1978; GUITIERREZ et al., 1982; MENES et al., 1984) SEC-Bildner waren. Aus der Übersicht von MAYER (1975) sowie NOTERMANS et al. (1984a) und den Publikationen von NISKANEN und KOIRANEN (1977), GARCIA et al. (1980), KATO und KUME (1980), LOMBAI et al. (1980) sowie BRÜCKLER et al. (1981) geht außerdem hervor, daß auch aus Mastitissekret und unveränderter Milch von Kühen herausgezüchtete enterotoxinogene *S. aureus*-Stämme relativ häufig SEC produzierten.

SEC läßt sich zwar in Kulturmedien in relativ großen Mengen gewinnen (s.a. Übersicht 1), ist aber für die Auslösung von Staphylokokken-Intoxikationen

Übersicht 1: Enterotoxinproduktion in Kulturmedien

(nach ROBBINS et al., 1974)

SE-Typ (<i>S. aureus</i> - Stamm-Nr.)	SE-Konzentration (µg/ml)			
	Schüttel- kultur	halbfestes Medium	Zellophan- membran- Technik ^{x)}	"sac-culture"- Verfahren
A (100)	2,6	4	19	14
B (901)	26,0	11	15	100
C ₁ (137)	72,0	20	143	360
D (472)	0,5	1 - 2	4	4
E (326)	4,1	10	16	16

^{x)} mit ca. 1 Jahr alter Membran erzielte Werte

seltener verantwortlich als SEA und SED (CASMAN et al., 1967; BERGDOLL, 1970; TERPLAN und ZAADHOF, 1981; u.a.). Dies ist - wie erst kürzlich von NOTERMANS et al. (1984a) bestätigt wurde - darauf zurückzuführen, daß die Synthese von SEC in Lebensmitteln aufgrund der intrinsischen und extrinsischen Faktoren sowie des Antagonismus anderer Mikroorganismen erheblich eingeschränkt ist. Die im Tierversuch mit Rhesusaffen sowie mit Freiwilligen bestimmte Toxizität von SEC ist offensichtlich nicht geringer als jene von SEA (Einzelheiten s. Abschnitt 2.1.5).

2.1.2 Produktion und Reinigung

Für die SEC-Synthese scheinen Plasmide - nach ALTBOUM et al. (1984) ein 56,2 - kb Penicillinase-Plasmid (pZA 10), auf dem auch die genetische Codierung der β -Lactamase lokalisiert ist - verantwortlich zu sein (BERGDOLL et al., 1974a). Allerdings ergaben Untersuchungen von BETLEY und BERGDOLL (1981), daß bei 5 SEC₁-Bildnern die Determinante für die SEC₁-Synthese chromosomal lokalisiert war. Die Synthese von SEC findet vermutlich in der Zellwand selbst oder deren Nachbarschaft statt (BERGDOLL, 1970; CZOP und BERGDOLL, 1970; BERGDOLL et al., 1974a). Neben diesen intrazellulären Faktoren (BAIRD-PARKER, 1971) spielen für die SEC-Bildung auch verschiedene extrazelluläre (z.B. Züchtungsverfahren, Nährmedium, Bebrütungstemperatur) eine entscheidende Rolle.

Zur Produktion von SEC finden fast ausschließlich flüssige Nährmedien Anwendung, während halb feste und feste Medien überwiegend zum Nachweis des Enterotoxinbildungsvermögens koagulasepositiver Staphylokokken eingesetzt werden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß sich bei Verwendung großer Nährboden-Volumina (z.B. in Fermentern) größere SEC-Mengen pro Ansatz gewinnen lassen. Die Wahl des Mediums wird wesentlich davon beeinflusst, ob nur das Enterotoxinbildungsvermögen geprüft oder SEC produziert werden soll, das anschließend einer Reinigung zu unterziehen ist. In letzterem Fall

Übersicht 2: Verschiedene Verfahren zur Reinigung von SEC

Reinigungs-schritt	Reinigungsverfahren nach					
	BORJA u. BERGDOLL (1967) SEC ₁	AVENA u. BERGDOLL (1967) SEC ₂	CHANG et al. (1971) SEC ₂	METZGER et al. (1975) SEC ₁	METZGER et al. (1975) SEC ₂	ROBERN et al. (1975 a) SEC ₂
1	Ionenaustauschchromatographie (CM-Cellulose)	Ionenaustauschchromatographie (CM-Cellulose)	Elektrophorese	Ionenaustauschchromatographie (Amberlite CG-50)	Ionenaustauschchromatographie (Amberlite CG-50)	Ionenaustauschchromatographie (QAE-Sephadex A-50)
2	Gelfiltration (Sephadex G-75)	Ionenaustauschchromatographie (CM-Cellulose)	Gelfiltration (Sephadex G-50)	Ionenaustauschchromatographie (Amberlite CG-50)	Ionenaustauschchromatographie (CM-Cellulose)	Gelfiltration (Sephadex G-100)
3	Gelfiltration (Sephadex G-50)	Gelfiltration (Sephadex G-75)	Isoelektrische Fokussierung	Ionenaustauschchromatographie (CM-Cellulose)	Ionenaustauschchromatographie (Hydroxylapatit)	Ionenaustauschchromatographie (QAE-Sephadex A-50)
4	Gelfiltration (Sephadex G-50)	Gelfiltration (Sephadex G-75)	Gelfiltration (Sephadex G-50)			Gelfiltration (Sephadex G-100)
5		Gelfiltration (Sephadex G-50)				

Reinigungsverfahren nach									
Reini- gungs- schritt	SHINAGAWA et al. (1975)	ODA (1978)	SEC ₂	KARSCH u. RICHTER (1979)	NOTERMANS u. DUFRENNE (1982)	ENDE et al. (1983)	SEC ₁	REISER et al. (1984)	SEC ₃
1	Ionenaustauschchromatographie (CM-Sephadex C-25)	Ionenaustauschchromatographie (SP-Sephadex C-25)		Ionenaustauschchromatographie (CM-Cellulose)	Ionenaustauschchromatographie (CM-Sephadex C-25)	Ionenaustauschchromatographie (CM-Cellulose)		Ionenaustauschchromatographie (Amberlite CG-50)	
2	Ionenaustauschchromatographie (DEAE-Sephadex A-25)	Gelfiltration (Sephadex G-75)		Ionenaustauschchromatographie (CM-Cellulose)	Ionenaustauschchromatographie (QAE-Sephadex A-25)	Gelfiltration (Sephadex G-50)		Ionenaustauschchromatographie (CM-Cellulose)	
3	Gelfiltration (Sephadex G-75)			Gelfiltration (Sephadex G-100)	Gelfiltration (Sephadex G-75)	Chromatofokussierung		Gelfiltration (Sephadex G-75)	
4				Isoelektrische Fokussierung					
5				Gelfiltration (Sephadex G-100)					

werden i.d.R. Medien aus niedermolekularen Substanzen (z.B. Proteinhydrolysate) bevorzugt. Untersuchungen von REISER und WEISS (1969) sowie VANDENBOSCH et al. (1973) haben ergeben, daß ein Medium aus 3 % Protein Hydrolysate Powder (PHP) plus 3 % NZ-Amine NAK besonders gut für die SEC-Produktion geeignet ist. Seitdem PHP nicht mehr im Handel erhältlich ist (MORITA et al., 1979), muß auf andere zur Verfügung stehende Proteinhydrolysate ausgewichen werden. Dabei kann ein Zusatz von Hefeextrakt oder Vitaminen vorteilhaft sein (BERGDOLL, 1979). Im allgemeinen erfolgt die Inkubation bei 35-37 °C (1-3 Tage), doch soll eine Temperatur von 40 °C eine höhere SEC-Ausbeute erbringen (TATINI et al., 1971; VANDENBOSCH et al., 1973). Bei Einsatz großer Nährboden-Volumina empfiehlt sich eine Belüftung auch der tiefen Schichten des Mediums (WOODBURN et al., 1973), doch sollte die Belüftungsrate nicht zu hoch sein (JARVIS et al., 1973).

Die gebräuchlichen Reinigungsverfahren sind entweder speziell auf SEC zugeschnitten (BORJA und BERGDOLL, 1967; AVENA und BERGDOLL, 1967; CHANG et al., 1971; METZGER et al., 1975; ROBERN et al., 1975a; REISER et al., 1984) oder für mehrere (ODA, 1978; ENDE et al., 1983; JANIN et al., 1984) bzw. alle bekannten SE-Typen brauchbar (SHINAGAWA et al., 1975; KARSCH und RICHTER, 1979; NOTERMANS et al., 1983b). Aus Übersicht 2, in der das aus zwei Schritten (Ionenaustauschchromatographie, Chromatofocussierung) bestehende Reinigungsverfahren von JANIN et al. (1984) aus Platzgründen nicht aufgeführt ist, geht hervor, daß die meisten Verfahren auf einer Kombination von Ionenaustauschchromatographie (Amberlite, CM-Cellulose, DEAE-, QAE-, CM- bzw. SP-Sephadex, Hydroxylapatit) und Gelfiltration (Sephadex G-50, G-75 bzw. G-100) basieren. Außerdem werden zum Teil auch Elektrophorese (CHANG et al., 1971), isoelektrische Fokussierung (CHANG et al., 1971; KARSCH und RICHTER, 1979) bzw. Chromatofokussierung (ENDE et al., 1983; JANIN et al., 1984) eingesetzt.

2.1.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Gereinigtes und lyophilisiertes SEC ist eine weiße, flaumige, stark hygroskopische Substanz (AVENA und BERGDOLL, 1967; BORJA und BERGDOLL, 1967).

Das Toxinmolekül ist ein einfach gebautes, aus einer einzelnen Polypeptidkette (HUANG et al., 1967; BERGDOLL et al., 1969; BERGDOLL und ROBBINS, 1973) bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 30.000 Dalton (s. Übersicht 3). Nach HUANG et al. (1967) besteht SEC₁ aus 296 und SEC₂ aus 294 Aminosäureresten. Bei späteren Untersuchungen

Übersicht 3: Molekulargewicht der verschiedenen SEC-Varianten

SE-Typ	Molekulargewicht	A U T O R (E N)
C ₁	34.100	BORJA und BERGDOLL (1967)
	26.000	SCHANTZ et al. (1972)
	28.000 - 29.000	METZGER et al. (1975)
	27.500	SCHMIDT und SPERO (1983)
	29.000	JANIN et al. (1984)
	27.293	REISER et al. (1984)
C ₂	34.000	AVENA und BERGDOLL (1967)
	30.000	CHANG et al. (1971)
	26.000	SCHANTZ et al. (1972)
	28.000 - 29.000	METZGER et al. (1975)
	29.000 - 29.500	ROBERN et al. (1975 a)
C ₃	28.900	REISER und BERGDOLL (1979)
	27.111	REISER et al. (1984)

wurden geringere Werte festgestellt. So fanden SCHMIDT und SPERO (1983) bei SEC₁ 239, bzw. ROBERN et al. (1975a) bei SEC₂ 255 Aminosäurereste. Für SEC₃ wurde die Anzahl der Aminosäurereste auf 236 geschätzt (REISER et al., 1984). SEC₁, SEC₂ und SEC₃ setzen sich zu etwa einem Drittel aus Lysin und Asparaginsäure zusammen (Übersicht 4) und enthalten, wie SEB, etwa viermal mehr Methionin als SEA und SEE (BERGDOLL et al., 1974b) sowie SED (BERGDOLL, 1983). Die Sequenzanalyse von SEC₁ (Übersicht 5) weist ebenfalls eine bemerkenswerte Übereinstimmung mit jener von SEB auf, insbesondere am C- und am N-terminalen Ende des Moleküls, wo 55 von 67 bzw. 38 von 57 Resten identisch sind (SCHMIDT und SPERO, 1983). Die C-terminale Aminosäure ist Glycin bei SEC₁ und SEC₂ (HUANG et al., 1967), für SEC₃ liegen noch keine Angaben vor (REISER et al., 1984). Die N-terminalen Aminosäuren sind Glutaminsäure bei SEC₁ und SEC₂ (HUANG et al., 1967) sowie bei SEC₃ (REISER und BERGDOLL, 1979).

Die drei SEC-Varianten stimmen - soweit bekannt - in den meisten chemischen und physikalischen Eigenschaften (Absorptionsmaximum, Extinktion, Stickstoffgehalt, Sedimentationskonstante, Diffusionskoeffizient, spezifische Viskosität, partialspezifisches Volumen) nahezu überein. Deutliche Unterschiede ergeben sich jedoch hinsichtlich der isoelektrischen Punkte, die in den originären Publikationen mit 8,6 für SEC₁ (BORJA und BERGDOLL, 1967), 7,0 für SEC₂ (AVENA und BERGDOLL, 1967) sowie 7,9 für SEC₃ (BERGDOLL, 1983) angegeben wurden. Später hat sich dann bei analytischen Untersuchungen gereinigter SEC₁-, SEC₂- und SEC₃-Präparationen mittels isoelektrischer Fokussierung oder Chromatofokussierung gezeigt, daß diese aus mehreren Komponenten - bei SEC₁ maximal sechs (YOTIS et al., 1974; ENDE et al., 1983) bei SEC₂ bis zu acht (DICKIE et al., 1972) - mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten bestehen (Übersicht 6). Trotz dieser "physikalischen" Differenzen bestehen offenbar keine Unterschiede in der Reaktion der einzelnen Komponenten mit dem spezifischen Antikörper bzw. in der biologischen Aktivität. Diese sog. Mikroheterogenität ist vermutlich dadurch bedingt, daß die saueren Komponenten aus basischen Komponenten aufgrund der Hydrolyse

Übersicht 4: Aminosäurezusammensetzung von SEC₁, SEC₂ und SEC₃
(in Gramm/100 Gramm Protein)

Aminosäure	SEC ₁ (a)	SEC ₂ (b)	SEC ₃ (c)
Lysin	14,43	13,99/14,51	13,73
Histidin	2,91	2,87/ 2,92	2,96
Arginin	1,71	1,75/ 1,75	1,62
Asparaginsäure	17,85	18,39/19,04	18,27
Threonin	5,31	5,80/ 5,58	6,07
Serin	4,58	4,81/ 5,23	5,64
Glutaminsäure	8,95	8,93/ 9,65	7,86
Prolin	2,16	2,23/ 2,35	2,30
Glycin	2,99	2,90/ 3,10	3,34
Alanin	1,85	1,61/ 1,62	1,74
Halb-Cystin	0,79	0,74/ 0,72	0,62
Valin	6,50	5,87/ 6,03	5,63
Methionin	3,20	3,60/ 3,54	3,72
Isoleucin	4,09	4,02/ 3,72	3,38
Leucin	6,54	6,13/ 6,32	6,58
Tyrosin	9,80	10,27/10,25	10,34
Phenylalanin	5,35	5,25/ 5,18	5,40
Tryptophan	0,99	0,84/ 0,59	1,5 ^{d)}
Amid NH ₂	1,71	1,62/ --	1,12

a) nach HUANG et al. (1967)

b) nach HUANG et al. (1967) bzw. ROBERN et al. (1975 a)

c) nach BERGDOLL (1983)

d) nach REISER et al. (1984)

Übersicht 5: Aminosäuresequenz von SEC₁ (nach SCHMIDT und SPERO, 1983)

1	10	20
Glu-Ser-Gln-Pro-Asp-Pro-Thr-Pro-Asp-Glu-Leu-His-Lys-Ala-Ser-Lys-Phe-Thr-Gly-Leu		
21	30	40
Met-Glu-Asn-Met-Lys-Val-Leu-Tyr-Asp-Asp-His-Tyr-Val-Ser-Ala-Thr-Lys-Val-Lys-Ser		
41	50	60
Val-Asp-Lys-Phe-Leu-Ala-His-Asp-Ile-Leu-Tyr-Asn-Ile-Ser-Asp-Lys-Lys-Leu-Lys-Asn		
61	70	80
Tyr-Asp-Lys-Val-Lys-Thr-Glu-Leu-Leu-Asn-Glu-Gly-Leu-Ala-Lys-Lys-Tyr-Lys-Asp-Glu		
81	90	100
Val-Val-Asp-Val-Tyr-Gly-Ser-Asn-Tyr-Tyr-Val-Asn-Cys-Tyr-Phe-Ser-Ser-Lys-Asp-Asn		
101	110	120
Val-Gly-Lys-Val-Thr-Gly-Gly-Lys-Thr-Cys-Met-Tyr-Gly-Gly-Ile-Thr-Lys-His-Glu-Gly		
121	130	140
Asn-His-Phe-Asp-Asn-Gly-Asn-Leu-Gln-Asn-Val-Leu-Ile-Arg-Val-Tyr-Glu-Asn-Lys-Asn		
141	150	160
Asn-Thr-Ile-Ser-Phe-Glu-Val-Gln-Thr-Asn-Lys-Lys-Ser-Val-Thr-Ala-Gln-Glu-Leu-Asp		
161	170	180
Ile-Lys-Ala-Arg-Asn-Phe-Leu-Ile-Asn-Lys-Lys-Asn-Leu-Tyr-Glu-Phe-Asn-Ser-Ser-Pro		
181	190	200
Tyr-Glu-Thr-Gly-Tyr-Ile-Lys-Phe-Ile-Glu-Asn-Asn-Gly-Asn-Thr-Phe-Trp-Tyr-Asp-Met		
201	210	220
Met-Pro-Ala-Pro-Gly-Asp-Lys-Phe-Asp-Gln-Ser-Lys-Tyr-Leu-Met-Met-Tyr-Asn-Asp-Ala		
221	230	239
Lys-Thr-Val-Asp-Ser-Lys-Ser-Val-Lys-Ile-Glu-Val-His-Leu-Thr-Thr-Lys-Asn-Gly		

Übersicht 6: Isoelektrische Punkte (P I) von SEC-Präparationen

SEC-Variante	P I	A U T O R (E N)
SEC ₁	8,6	BORJA und BERGDOLL (1967)
	9, 19/8,83 (Hauptkomponenten)	METZGER et al. (1975)
	8,6/8,44/8,28	
	8, 11/8,0/7,91	ENDE et al. (1983)
	8,3/7,9	JANIN et al. (1984)
SEC ₂	7,0	AVENA und BERGDOLL (1967)
	6,65/5,90/5,50	CHANG et al. (1971)
	7,35/6,95/6,75/6,55	
	6,20/5,95/5,70/5,50	DICKIE et al. (1972)
	8,4/7,1 (Hauptkomponenten)	METZGER et al. (1975)
	6,13/5,73/5,45	STAVRIC et al. (1975)
	7,6/7,3/6,8/6,2	ODA (1978)
SEC ₃	7,9	REISER und BERGDOLL (1979)
	8,25 bis 6,55 (Hauptkomponente:	
	8, 15)	REISER et al. (1984)

labiler Amidgruppen entstehen (CHANG et al., 1971; DICKIE et al., 1972).

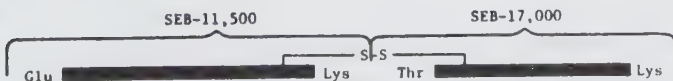
Eine derartige Umwandlung kann während der Produktion - besonders bei längerer Inkubation der Nährmedien und alkalischem Milieu (METZGER et al., 1975) -, der Reinigung, der isoelektrischen Fokussierung oder der Lagerung des (gereinigten) SEC erfolgen (DICKIE et al., 1972; YOTIS et al., 1974; METZGER et al., 1975; BERGDOLL, 1976).

SEC ist - ähnlich den anderen SE-Typen - recht stabil gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen (BERGDOLL, 1979). So bedingt z.B. die Zugabe von Trypsin nur eine begrenzte Hydrolyse des Moleküls (SPERO et al., 1973). Dabei wird nach SPERO et al. (1976) die Polypeptidkette von SEC_1 zuerst innerhalb der von beiden Halb-Cystinen gebildeten Disulfidschleife (BERGDOLL, 1976) zwischen Position 92 und 93 (Lysin und Valin) "gespalten" ($SEC_1 - T_1$) und danach außerhalb der Disulfidschleife zwischen Position 57 und 58 (Lysin und Asparaginsäure). Das hierbei entstehende Produkt ($SEC_1 - T_2$) ist nach Angabe der letztgenannten Autoren ebenso wie $SEC_1 - T_1$ dem nativen SEC_1 hinsichtlich der chemisch-physikalischen Eigenschaften sehr ähnlich und weist auch bezüglich der antigenen und toxischen (emetischen) Aktivität keine Unterschiede auf. $SEC_1 - T_2$ läßt sich zwar unter bestimmten Voraussetzungen (z.B. Zugabe von Denaturantien und Alkylierung der reduzierten Disulfidschleife) in Fragmente (Übersicht 7) auf-

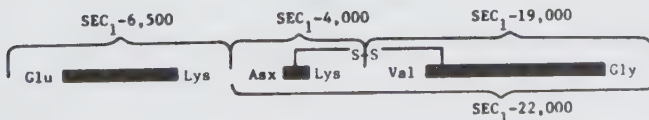
Übersicht 7: Tryptische Polypeptide von SEB bzw. SEC_1

(nach SPERO und MORLOCK, 1979)

SEB-T



$SEC_1 - T_2$



spalten, doch bleiben die für die Wirkung von SEC₁ wesentlichen Eigenschaften - wenn auch auf verschiedene Fragmente begrenzt (z.B. SEC₁ - 6.500 und SEC₁ - 19.000 antigen; SEC₁ - 22.000 emetisch wirksam) - erhalten. Da im Zusammenhang mit der Stabilität von SEC insbesondere diese Eigenschaften von Bedeutung sind, wird hierauf noch in den beiden folgenden Abschnitten (2.1.4 bzw. 2.1.5) etwas näher eingegangen.

2.1.4 Antigene Eigenschaften

SEC₁, SEC₂ und SEC₃ sind - ebenso wie die bisher bekannten SE-Typen - hochmolekulare Proteine, die einerseits in der Lage sind, im Wirbeltierorganismus eine Antikörperbildung anzuregen und zum anderen die Fähigkeit haben, mit dem gebildeten Antikörper (AK) spezifisch zu reagieren. Anfänglich wurde davon ausgegangen, daß keine Unterschiede in den Reaktionen von SEC₁ und SEC₂ mit dem homologen bzw. heterologen AK bestehen (BERGDOLL et al., 1965). Von AVENA und BERGDOLL (1967) wurde dann zwar aufgrund der Reaktionen im Einfach-Gel-Diffusionstest ein sehr geringer Unterschied in der Antigenität der beiden SEC-Varianten für möglich gehalten, doch wurde dieser Frage keine weitere Aufmerksamkeit geschenkt. Bei genauer Kontrolle der Verhältnisse zeigte sich aber später, daß sich mit dem heterologen AK tatsächlich eine etwas abweichende Reaktion ergibt (BERGDOLL und ROBBINS, 1973; BERGDOLL et al., 1973). Dies wurde darauf zurückgeführt, daß SEC₁ und SEC₂ zwar die gleichen Haupt-Antigen-Determinanten besitzen, jede Variante aber eine spezifische Neben-Antigen-Determinante aufweist. Der Unterschied wurde als praktisch bedeutungslos angesehen (BERGDOLL und ROBBINS, 1973), was sich aber bei weiteren Untersuchungen als falsch erwies, da sich SEC₂-Bildner im Gel-Diffusionstest mit Anti-SEC₁ nicht immer nachweisen ließen (BERGDOLL, 1974 und 1977; LEE et al., 1980; REISER et al., 1984).

Hieraus ergab sich dann die Empfehlung, zum SEC-Nachweis Anti-SEC₂

einsetzen (BERGDOLL, 1974 und 1977).

Die Existenz von SEC_3 wurde aus der Beobachtung an einem *S. aureus*-Stamm abgeleitet, der im Gel-Diffusionstest mit Anti- SEC_1 schwach, mit Anti- SEC_2 aber stark und im Radio-Immuno-Test (RIA) mit beiden AK stark reagierte (REISER et al., 1984). Daraufhin im Gel-Diffusionstest durchgeführte Experimente ergaben, daß bei Verwendung von Anti- SEC_1 bzw. Anti- SEC_2 keine Unterschiede in den Reaktionen von SEC_2 und SEC_3 auftraten und gegenüber Anti- SEC_3 alle drei Varianten gleichartig reagierten. In ergänzenden Versuchen zeigte sich dann aber, daß SEC_1 , SEC_2 und SEC_3 bezüglich ihrer Antigenität nicht identisch sind.

SEB hat wahrscheinlich ähnliche antigene Determinanten wie SEC. Diese aufgrund einer Reaktion von gereinigtem SEC_1 mit SEB-Antiserum vom Kaninchen erstmalig von GRUBER und WRIGHT (1969) geäußerte Vermutung wurde später u.a. von JOHNSON et al. (1972), BERGDOLL und ROBBINS (1973), BERGDOLL et al. (1973), BERGDOLL (1977) sowie SPERO et al. (1978) bestätigt, von LEE et al. (1980) sowohl für SEC_1 als auch SEC_2 - jedoch nur bei sechs von neun SEB-Antisera. Umgekehrt ergaben zwei von drei SEC_1 -Antisera (allerdings nicht so stark ausgeprägte) Kreuzreaktionen mit gereinigtem SEB, während alle fünf geprüften SEC_2 -Antisera im Gel-Diffusionstest nicht mit dem SEB reagierten (LEE et al., 1980). SPERO et al. (1978) gingen aufgrund ihrer Ergebnisse davon aus, daß diese Kreuzreaktionen Folge einer sehr ähnlichen - aber nicht identischen - Struktur einer der drei Haupt-Antigen-Determinanten beider SE seien.

Weiterführende Experimente von SPERO und MORLOCK (1979) an tryptischen Polypeptiden von SEB und SEC_1 (s.a. Übersicht 7) ergaben die Existenz jeweils zweier antigenen Determinanten, die zu einer Reaktion mit dem heterologen AK (Anti-SEB bzw. Anti- SEC_1) befähigt waren. SEC_1 - 19.000 bzw. SEB - 17.000 reagierten stark mit dem homologen und etwas schwächer mit dem heterologen AK. Die Bindungskapazität von SEC_1 - 6.500 bzw.

SEB - 11.500 war insgesamt deutlich geringer, doch bestanden kaum Unterschiede zwischen homologem und heterologem AK. SPERO und MORLOCK (1979) vermuteten, daß die Determinanten von SEC_1 - 6.500 und SEB - 11.500 primär für die gute heterologe Bindung bei den nicht-hydrolysierten SE verantwortlich sind.

Offensichtlich treten Kreuzreaktionen von SEC mit Anti-SEB bzw. SEB mit Anti-SEC nicht nur bei Verwendung von polyklonalen AK, sondern auch von monoklonalen AK auf. Nach THOMPSON et al. (1984) reagierte nämlich einer von vier gegen SEB produzierten AK im RIA mit SEC_1 ebenso wie das Anti- SEC_1 mit reinem SEB. Kreuzreaktionen zwischen SEB und monoklonalem Anti- SEC_2 bzw. Anti- SEC_3 wurden jedoch nicht registriert. MEYER et al. (1984) hatten zuvor von einem nach Applikation von SEA und SED erhaltenen monoklonalen AK berichtet, der die höchste Affinität gegenüber SEB und SEC_1 aufwies und desweiteren mit SEA, SED und SEE reagierte. Die Eignung dieses AK zum Nachweis aller bisher bekannten serologischen SE-Typen wurde bisher von anderer Seite offensichtlich noch nicht geprüft.

Die von JOHNSON et al. (1972) im RIA beobachtete Kreuzreaktion von Anti-SEA mit relativ hohen Konzentrationen von gereinigtem SEC konnte von SPERO et al. (1978) nicht bestätigt werden. Über andere Kreuzreaktionen von SEC bzw. Anti-SEC wurde in der Literatur nicht berichtet.

Die in Abschnitt 2.1.3 erwähnte ausgeprägte Stabilität von SEC gegenüber chemischen und physikalischen Faktoren betrifft auch die antigenen Eigenschaften. Auf die Tatsache, daß durch Zusatz von Trypsin zu SEC die Reaktion mit dem spezifischen AK nicht beeinträchtigt wird, wurde bereits hingewiesen. Entsprechendes gilt nach REISER et al. (1984) bei SEC_3 auch für Pepsin (pH 4,5); bei SEC_1 und SEC_2 wurden derartige Experimente nicht durchgeführt (BERGDOLL, 1983). Durch Säuren und Laugen kann es zu einer Proteindenaturierung kommen, doch erfolgt eine Inaktivierung der serologischen Aktivität offensichtlich nur bei sehr niedrigen - z.B. pH 1,8 bei SEC_2 (AVENA und BERGDOLL, 1967) - oder sehr hohen pH-Werten - z.B.

pH 11,5 bei SEC₁ (BORJA und BERGDOLL, 1969). SEC erweist sich auch gegenüber einer Vielzahl von sonstigen Chemikalien als so stabil, daß z.B. für die im Labor erforderliche unschädliche Beseitigung relativ hohe Konzentrationen an geeigneten Detoxifizierungsmitteln (z.B. 3,75 % Chloramin T für ein Kulturfiltrat mit 18,5 µg SEC₁/ml) erforderlich sind. Auf Einzelheiten zu den verschiedenen geprüften chemischen Substanzen soll im Hinblick auf die ausführlichen Darstellungen bei TERPLAN und ZAADHOF (1981), WENZEL (1981) sowie ZAADHOF und TERPLAN (1983) hier nicht eingegangen werden. Auch bei Erhitzung ist eine vollständige Zerstörung der antigenen Eigenschaften von SEC nicht gewährleistet. I.d.R. bedingen Temperaturen von über 60 °C (s. Übersicht 8) eine Inaktivierung der SEC, wobei deren Grad von Ein-

Übersicht 8: Inaktivierung von SEC₁ bzw. SEC₂ nach Erhitzung
(nach TERPLAN und ZAADHOF, 1981)

SE-Typ (µg/ml)	pH	Einwirkungs-		serolog. Restaktivität (%)	AUTOREN
		temperatur (°C)	dauer (min)		
SEC ₁					
120 x)	7,5	55	60	100	BORJA u. BERGDOLL (1967)
120 x)	7,5	60	30	100	" "
18,5	8,2	70	10	69	eigene Versuche
100	7,4	80	300	25	FUNG et al. (1973)
100	7,4	100	180	0	" "
100	7,4	121	30	0	" "
SEC ₂ x)	?	100	1	20	AVENA und BERGDOLL (1967)

x) gereinigtes SEC

wirkungstemperatur und -dauer, vom Reinheitsgrad des SEC sowie von Art und pH-Wert des Erhitzungsmediums abhängt. Bei nicht vollständig hitze-inaktiviertem SEC ist unter günstigen Voraussetzungen offensichtlich eine Reaktivierung möglich (FUNG et al., 1973). Nach Angaben der letztgenannten Autoren ist SEC im übrigen hitzeresistenter als SEB und SEA; Vergleiche mit SED und SEE liegen bisher nicht vor.

2.1.5 Toxische Eigenschaften

SEC ist wie die anderen SE nach oraler Aufnahme für die Auslösung der auch als Enterotoxikose bezeichneten Staphylokokken-Intoxikation verantwortlich. Diese recht häufig zu registrierende Lebensmittelvergiftung ist dadurch gekennzeichnet, daß sich gewöhnlich 1 bis 6 Std. nach der Aufnahme des SE-haltigen Lebensmittels heftiges Erbrechen, oft auch Durchfall einstellt. Andere Symptome können sein: Speichelfluß, Übelkeit, abdominale Krämpfe, Kopfschmerz, Schweißausbruch, Muskelkrämpfe und Erschöpfung. In schweren Fällen wurde beobachtet: Anstieg oder auch Abfall der Körpertemperatur in subnormale Bereiche, Blutdruckabfall, Auftreten von Blut bzw. Schleim im Stuhl und im Erbrochenen sowie starke Nierenschmerzen (Koliken). Die gesundheitliche Wiederherstellung des Erkrankten erfolgt i.d.R. innerhalb von 24 bis 48 Std.; Todesfälle (z.B. durch Kreislaufkollaps) sind äußerst selten.

Nach DANGERFIELD (1973), der Untersuchungen über die Toxizität von gereinigtem, per os verabreichtem SEA, SEB und SEC beim Menschen durchführte (Übersicht 9) beträgt die mittlere krankmachende Dosis - unabhängig vom SE-Typ - ungefähr $0,14 \mu\text{g/kg}$ Körpergewicht. Versuchstiere - i.a. ca. 1,5-3 kg schwere Rhesusaffen - reagieren etwas weniger empfindlich als der Mensch, doch bestehen offensichtlich keine Unterschiede in der mittleren emetischen Dosis (ED_{50}) der drei SEC-Varianten (Übersicht 10) bzw. aller SE-Typen. Über klinische Symptome nach aerogener Aufnahme von SEC oder intravenöser Applikation (Versuchstiere) ist im Gegensatz zu SEA und SEB

Übersicht 9: Für die Auslösung von Staph.-Intoxikationen erforderliche SE-Mengen (nach DANGERFIELD, 1973)

SE-Typ	SE-Menge in $\mu\text{g/kg (ID}_{50})^{\text{x)}}$	Vertrauensbereich (95%)
A	0,134	0,083 - 0,215
B	0,150	0,008 - 2,690
C	0,183	0,028 - 1,200
A, B, C	0,140	0,026 - 0,757

^{x)} ID₅₀: Krankmachende Dosis bei 50 % der Versuchspersonen

Übersicht 10: Mittlere emetische Dosis (ED₅₀) der SEC-Varianten bei oraler Verabreichung an Affen

SE-Variante	ED ₅₀ ($\mu\text{g/Tier}$)	AUTOR(EN)
C ₁	20	BERGDOLL et al. (1965)
	5	BORJA und BERGDOLL (1967)
	10	BERGDOLL et al. (1971)
C ₂	20	BERGDOLL et al. (1965)
	5-10	AVENA und BERGDOLL (1967)
C ₃	5-10	BERGDOLL (1983)
	10	REISER et al. (1984)

bisher nichts bekannt.

Zur Frage der Stabilität der toxischen Aktivität von SEC gegenüber chemischen oder physikalischen Prinzipien wurde in der Literatur nur ein Hinweis gefunden. WARREN et al. (1975) berichteten in dieser Arbeit, daß nach Zugabe von Formaldehyd zu SEC₁ (bei pH 5,0; 7,5 bzw. 9,5) die im Affenfütterungstest bestimmte toxische Aktivität zerstört war und die Versuchstiere selbst bei Verabreichung der 70fachen letalen intravenösen Dosis nicht erbrachen. Da die antigene Wirkung außer bei dem bei pH 9,5 hergestellten Enterotoxoid nicht vollständig verloren ging (bei Enterotoxoid pH 5,0 zu 60 %, bei Enterotoxoid pH 7,5 zu 85 %), ist sie offensichtlich etwas stabiler. Zwar wird aufgrund der Erfahrungen bei SEB (SCHANTZ et al., 1965; READ und BRADSHAW, 1966; JAMLANG et al., 1971; MEYER et al., 1977) i.a. davon ausgegangen, daß zwischen toxischer und serologischer Aktivität von Inaktivierungsmaßnahmen unterworfenen SE keine wesentlichen Unterschiede bestehen, doch ist dies für SEC bisher noch nicht umfassend geprüft worden.

2.2 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln mittels serologischer Methoden

2.2.1 Allgemeines

Da der Affenfütterungstest (SURGALLA et al., 1953) wegen der erheblichen Anschaffungs- und Haltungskosten sowie tierschützerischer Aspekte nicht mehr für Routineuntersuchungen herangezogen wird und andere biologische Verfahren sich entweder aufgrund zu geringer Spezifität und Empfindlichkeit - z.B. Kätzchentest, Froschspermatetest - als nicht geeignet erwiesen haben (GANTZE, 1976) oder noch nicht endgültig zu beurteilen sind - direkter Hauttest an sensibilisierten Meerschweinchen (SCHEUBER et al., 1983) -, stellen serologische Nachweisverfahren das Mittel der Wahl dar. In der Literatur sind viele verschiedene Methoden beschrieben worden (Über-sichten dazu bei BERGDOLL, 1970 und 1977; HOLBROOK und BAIRD-PARKER,

1975; SOMMERFELD und TERPLAN, 1975; MINOR und MARTH, 1976; TERPLAN und ZAADHOF, 1981; u.a.). Die Eignung dieser Verfahren hängt dabei u.a. ab von Spezifität, Empfindlichkeit, Praktikabilität sowie Zeit- und Materialaufwand. Die Sicherheit, daß unspezifische Reaktionen nicht zu Fehlbeurteilungen führen, ist insbesondere bei der auf Präzipitation des Antigens durch den spezifischen Antikörper beruhenden radialen Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY gegeben. Dieser auch relativ einfach durchzuführende Test kann jedoch nicht für den unmittelbaren Nachweis von SE in Lebensmitteln eingesetzt werden, da geringe, aber noch krankmachende Toxinmengen aufgrund mangelnder Empfindlichkeit nicht erfaßt werden und in Lebensmitteln enthaltene Substanzen eine positive Reaktion überdecken können (CASMAN und BENNETT, 1965; BERGDOLL, 1970; SOMMERFELD und TERPLAN, 1975; u.a.). Infolgedessen ist vor dem SE-Nachweis eine zeit- und arbeitsaufwendige Extraktion, Konzentrierung und Teilreinigung der SE unerläßlich. Zu diesem Zweck sind unzählige Methoden erarbeitet worden (Übersicht im deutschen Schrifttum bei SOMMERFELD und TERPLAN (1975) sowie SCHEGGER (1978)). Von diesen Extraktionsmethoden hat das erstmals von CASMAN und BENNETT (1965) beschriebene, später an der Food and Drug Administration modifizierte (BENNETT und McCLURE, 1980) und unter die AOAC-Methoden aufgenommene Verfahren die weiteste Verbreitung gefunden. Bei den einzelnen Schritten kommt es - wie von NISKANEN und LINDROTH (1976) in Modellexperimenten mit radioaktiv markiertem SEA festgestellt wurde - zu erheblichen Verlusten: etwa 30 % bei der Chloroformextraktion, etwa 50 % bei der Ionenaustauschchromatographie mit Amberlite CG 50 bzw. etwa 25 % bei der Konzentrierung des Materials in Dialysierschläuchen. Der SE-Nachweis erfolgt anschließend im Hinblick auf den Materialaufwand in Form eines Objektträger-Tests (CASMAN und BENNETT, 1963). Die Ergebnisse können frühestens nach einem Tag abgelesen werden, so daß in Abhängigkeit von der Art des untersuchten Lebensmittels insgesamt ein Zeitaufwand von etwa 4-7 Tagen (ZAADHOF, 1978b) erforderlich ist. Bei negativem Ausfall des OUCHTERLONY-Tests kann davon ausgegangen

werden, daß das betreffende Lebensmittel weniger als $0,1 \mu\text{g SE}/100 \text{ g}$ oder 100 ml enthält und somit kein Risiko für den Konsumenten beinhaltet. Im Hinblick auf den bei Durchführung des Gel-Diffusionstests erforderlichen erheblichen Zeitaufwand hat man versucht, durch Einsatz von Verfahren mit wesentlich größerer Empfindlichkeit eine Abkürzung der Extraktion zu erreichen. Von den hierfür empfohlenen Methoden - z.B. umgekehrte passive Hämagglutination, Latex-Agglutination, Radio-Immunist, Enzym-Immunist - haben Enzym-Immunist die größte Bedeutung gewonnen.

2.2.2 Enzymimmunmethoden

2.2.2.1 Allgemeines

Seit ENGVALL und PERLMANN (1971) sowie van WEEMEN und SCHUURS (1971) den ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay) einführten, haben Enzym-Immunist (Enzyme Immunoassay; EIA) in der serologischen Routinediagnostik zunehmend an Bedeutung gewonnen (SCHUURS und van WEEMEN, 1980). Der EIA funktioniert nach demselben Prinzip wie der schon seit längerem (YALOW und BERSON, 1959) bekannte RIA (Radioimmunoassay) - allerdings mit einem Enzym statt einem Radioisotop als Marker - und weist diesem gegenüber einige Vorteile auf (Übersicht 11). Eine ausführliche Darstellung der homogenen (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) und heterogenen, in kompetitive und nicht-kompetitive unterteilbare, Enzym-Immunistmethoden findet sich unter anderem in den Übersichtsarbeiten von SCHUURS und van WEEMEN (1977), VOLLER et al. (1979) sowie ENGVALL (1980) und einer Dissertation dieses Instituts (LINZ, 1983). Der erste Hinweis auf den Einsatz von EIA im Zusammenhang mit SE stammt von SAUNDERS (1974), dem es gelang, reines SEA (mit $10^{-3} \mu\text{g}$ beladene Millipore-Scheiben) in einem indirekten ELA (enzyme labeled antibody)-System nachzuweisen.

Übersicht 11: Vergleich zwischen Enzym- und Radioimmunoassay
(nach GÖBEL, 1979)

	RIA	EIA
Sensitivität	++++	+++
Spezifität	+++	+++
Präzision	+++	+++
Stabilität	Tage bis Wochen	6 - 12 Monate
Mikrosysteme	Nein	Ja
Ausstattung	aufwendig	einfach
Automatisierbarkeit	++	++++
Räumlichkeiten	spezielle Arbeitsräume/-plätze erforderlich	keine abgetrennten Arbeitsplätze erforderlich
Kosten	+++	++
Personal	besondere Ausbildung notwendig	keine besondere Ausbildung notwendig
gesetzliche Auflagen	Strahlenbelastung Strahlenschutzverordnung	keine
Abfallproblem	+++	Ø

2.2.2.2 Nachweis von SE in Lebensmitteln

Untersuchungen an Lebensmitteln wurden 1977 von SAUNDERS und BARTLETT (Sandwich-Technik) sowie SIMON und TERPLAN (kompetitive Technik) beschrieben. Der von letzteren für den SEB-Nachweis konzipierte Test basierte auf dem kompetitiv-simultanen Prinzip. Hierfür wurde durch Ammonium- oder Natriumsulfatfällung gereinigtes Kaninchen-IgG auf einen Proteingehalt von

5 µg/ml eingestellt, an Polystyrolröhrchen adsorbiert (3 h im Wasserbad bei 37 °C) und nach dem Waschen mit Tween-NaCl über Nacht mit einer 1 %-igen BSA-PBS-Lösung abgesättigt. Vor der Durchführung des Tests wurde das Immunsorbens nochmals gewaschen, dann wurden je 0,5 ml Lebensmittel-extrakt und enzymmarkiertes Toxin zugegeben und 1/2 h bei Zimmertemperatur auf dem Taumler inkubiert. Nach dem Abkippen des Reaktionsgemisches wurde gewaschen, mit 1 ml Substratlösung (o-Dianisidin) beschickt, erneut 1/2 h bei Zimmertemperatur auf dem Taumler inkubiert, die Reaktion mit 1 Tropfen 5 N HCl gestoppt und das Reaktionsprodukt bei 400 nm photometrisch gemessen. FEY und STIFFLER-ROSENBERG (1977) modifizierten dieses Verfahren. Sie benutzten Polystyrol-Petrischalen als Festkörperphase, inkubierten im titrimetrischen Verfahren zunächst 6 h mit 20 ml SE-haltigem Extrakt und anschließend über Nacht mit einem SEB-Phosphatase-Konjugat. Die Reaktion mit p-Nitro-phenylphosphat wurde nach 30 min mit 2 N NaOH gestoppt und bei 403 nm ausgewertet. Später wurden diese und andere Techniken in verschiedenen Modifikationen eingesetzt. Bei den untersuchten Lebensmitteln handelte es sich u.a. um Milch und Milchprodukte (FEY und STIFFLER-ROSENBERG, 1977; SAUNDERS und BARTLETT, 1977; SIMON, 1978; STIFFLER-ROSENBERG und FEY, 1978; KOPER et al., 1980; KAUFFMAN, 1980; ACKERMAN und CHESBRO, 1981; FREED et al., 1982; OLSVIK et al., 1982; FEY et al., 1984; LOHNEIS, 1984; NOTERMANS et al., 1984b), Fleisch und Fleischwaren (FEY und STIFFLER-ROSENBERG, 1977; SAUNDERS und BARTLETT, 1977; SIMON, 1978; STIFFLER-ROSENBERG und FEY, 1978; KAUFFMAN, 1980; FREED et al., 1982; NOTERMANS et al., 1983a; FEY et al., 1984; LOHNEIS, 1984; NOTERMANS et al., 1984b), Salate, wie Schinken-, Kartoffel- oder Reissalat (KAUFFMAN, 1980; FREED et al., 1982; FEY et al., 1984; NOTERMANS et al., 1984b), Mayonnaise (SAUNDERS und BARTLETT, 1977; STIFFLER-ROSENBERG und FEY, 1978) und Vanillepudding (BÜNING-PFAUE et al., 1981).

Angaben zu Empfindlichkeit und Testdauer dieser zum Nachweis eines oder mehrerer SE-Typen eingesetzten Verfahren, für die Recovery-Raten von

40-100 % (SAUNDERS und BARTLETT, 1977; KAUFFMAN, 1980; BÜNING-PFAUE et al., 1981; NOTERMANS et al., 1983a und 1984b; LOHNEIS, 1984) angegeben wurden, sind in Übersicht 12 zusammengefaßt. Ein weiteres Verfahren ist der von MORITA und WOODBURN (1978) entwickelte, etwa 18 Std. erfordernde homogene EIA, der an mit SEB kontaminierten Lebensmitteln (Milch, Wiener, Mayonnaise) erprobt wurde und eine Nachweisgrenze von 5 ng/ml Extrakt aufwies.

Derzeit kommen fast ausschließlich Sandwich-Verfahren zur Anwendung. Dies ist darauf zurückzuführen, daß diese Technik z.B. etwas empfindlicher ist als der kompetitive ELISA (FEY et al., 1982; TERPLAN, 1982; LINZ, 1983), die oft schwierige Herstellung großer Mengen gereinigter SE (insbesondere SED und SEE) entfällt und die Einstellung der Reaktionspartner wenig kritisch ist, da die Reagenzien im Überschuß zugegeben werden (FEY et al., 1982). Als Material für die Festkörperphase wurde bei den Sandwich-Verfahren neben Polyvinyl meist Polystyrol in Form von Mikrotiterplatten, Röhrchen oder Perlen verwendet (Übersicht 13). Die Beschichtung erfolgte mit unbehandeltem, toxinspezifischem Antiserum (OLSVIK et al., 1982), mit der durch Ammoniumsulfatfällung gewonnenen γ -Globulinfraktion (SAUNDERS und BARTLETT, 1977; ACKERMAN und CHESBRO, 1981; FREED et al., 1982; FEY et al., 1984) oder mit isoliertem IgG (KOPER et al., 1980; BÜNING-PFAUE et al., 1981; van der OUDERAA und HAAS, 1981; NOTERMANS et al., 1983a; FEY et al., 1984; LOHNEIS, 1984; NOTERMANS et al., 1984b). Die Antisera wurden im übrigen - wie aus Übersicht 13 zu ersehen ist - durch Immunisierung von Kaninchen, Schafen oder Ziegen gewonnen. Die AK-Adsorption an die Festkörperphase erfolgte bei pH 7,2 (KOPER et al., 1980; BÜNING-PFAUE et al., 1981; NOTERMANS et al., 1983a; NOTERMANS et al., 1984b) oder pH 9,6 (FREED et al., 1982; OLSVIK et al., 1982; FEY et al., 1984; LOHNEIS, 1984), wobei das Trägermaterial 3 h bei 37 °C (LOHNEIS, 1984), über Nacht bei Raumtemperatur (KOPER et al., 1980; BÜNING-PFAUE et al., 1981; FREED et al., 1982; NOTERMANS et al., 1983a; FEY et al., 1984; NOTERMANS et al., 1984b) bzw. 4 °C (FREED et al., 1982) oder 48 h bei 4 °C (OLSVIK et al., 1982) beschichtet wurde. Nach Abschluß der AK-Ad-

Übersicht 12: Nachweis von SE in Lebensmitteln mit ELISA

Art des ELISA	Empfindlichkeit ng/ml ¹⁾ bzw. g ²⁾	SE-Typ	Testdauer ³⁾ (h)	AUTOR (EN)
Kompetitiv	5 - 10 ¹⁾	B	ca. 22	FEY und STIFFLER-ROSENBERG (1977)
Sandwich	1,6 - 3,2 ¹⁾	A	ca. 2,5	SAUNDERS und BARTLETT (1977)
Kompetitiv	0,1 - 1 ¹⁾	B	ca. 1	SIMON und TERPLAN (1977)
"	0,06 - 0,1 ¹⁾	A, B, C		FEY (1978)
"	0,1 ¹⁾	B	ca. 1	SIMON (1978)
"	0,06 - 0,1 ¹⁾	A, B, C	ca. 20	STIFFLER-ROSENBERG und FEY (1978)
Sandwich	10 - 20 ²⁾	B	ca. 3,5	KOPER et al. (1980)
Kompetitiv	2 ¹⁾	A	ca. 16	KAUFFMAN (1980)
Sandwich	3,2 / 6,3 ¹⁾	A / B	ca. 2,5	ACKERMAN und CHESBRO (1981)
"	1 ²⁾	B	ca. 3,5	BÜNING-PFAUE et al. (1981)
"	1 ²⁾	A - E	ca. 3	FREED et al. (1982)
"	1 ¹⁾	A, B, C	ca. 19	OLSVIK et al. (1982)
"	5 ²⁾	A, B, C, E	ca. 3,5	NOTERMANS et al. (1983a)
"	0,1 ¹⁾	A - D	ca. 22	FEY et al. (1984)
"	1 ¹⁾	B	ca. 1,5	LOHNEIS (1984)
"	5 ²⁾	A, B, C, E	ca. 3,5	NOTERMANS et al. (1984b)

1) Lebensmittelextrakt

2) Lebensmittel

3) ohne Extraktion

Immunosorbens vorbereitet

Übersicht 13: Einige Parameter der verschiedenen, für die Untersuchung von Lebensmitteln beschriebenen Sandwich-Verfahren

Festkörperphase	Antikörper	Enzym	Substrat	Reaktion gestoppt	Messung bei	AUTOR (EN)
PS-Mikrotiterplatten ¹⁾	Kaninchen	HRPO ³⁾	ABTS ⁷⁾	ja	414 nm	SAUNDERS und BARTLETT (1977), ACKERMAN und CHESBRO (1981)
PS-Röhrchen	Kaninchen	HRPO	5-AS ⁵⁾	ja	479 nm	KOPER et al. (1980)
PS/PV ²⁾ -Mikrotiterplatten	Schaf	HRPO	5-AS	nein	450 nm	BÜNING-PFAUE et al. (1981), NOTERMANS et al. (1983a), NOTERMANS et al. (1984b)
PS-Perlen/ PS-Mikrotiterplatten	Kaninchen/ Schaf	HRPO	ABTS	ja	414 nm	FREED et al. (1982)
PS-Mikrotiterplatten	Ziege/ Kaninchen	ALP ⁴⁾	NPP ⁶⁾	ja	410 nm	OLSVIK et al. (1982)
PS-Röhrchen/ PS-Perlen	Kaninchen	ALP	NPP	nein	405 nm	FEY et al. (1984)
PS-Mikrotiterplatten	Schaf	HRPO	OPD ⁸⁾	ja	490 nm	LOHNEIS (1984)

1) Polystyrol

2) Polyvinyl

3) Meerrettichperoxidase

4) alkalische Phosphatase

5) 5-Amino-Salicylsäure

6) p-Nitro-phenylphosphat

7) 2,2-Azino-di(3-äthyl-benzathiazolin-6-sulfonat)

8) o-Phenylendiamin

sorption und nach jedem weiteren Inkubationsschritt wurde das Immunosorbens gewaschen. SAUNDERS und BARTLETT (1977) sowie ACKERMAN und CHESBRO (1981) benutzten dazu Kochsalzlösung, der FEY et al. (1984) und LOHNEIS (1984) Tween 20 zugaben. KOPER et al. (1980), BÜNING-PFAUE et al. (1981), NOTERMANS et al. (1983a) und NOTERMANS et al. (1984b) spülten mit Leitungswasser, FREED et al. (1982) und OLSVIK et al. (1982) mit PBS, wobei die Waschlösungen jeweils Tween enthielten. Anschließend wurde die Probe zugegeben, wobei für die Leerwerte und zur Verdünnung des Standards i.a. toxfreie Lebensmittelextrakte (SAUNDERS und BARTLETT, 1977; ACKERMAN und CHESBRO, 1981; FREED et al., 1982; OLSVIK et al., 1982; FEY et al., 1984; LOHNEIS, 1984) oder PBS-Tween (BÜNING-PFAUE et al., 1981; NOTERMANS et al., 1983a; NOTERMANS et al., 1984b) verwendet wurden. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 40 min bis zwei Stunden (SAUNDERS und BARTLETT, 1977; ACKERMAN und CHESBRO, 1981; FREED et al., 1982; NOTERMANS et al., 1983a; LOHNEIS, 1984; NOTERMANS et al., 1984b) oder über Nacht (FEY et al., 1984) bzw. ein bis zwei Stunden bei 37 °C (KOPER et al., 1980) in einer feuchten Kammer (OLSVIK et al., 1982).

Konjugat wurde durch Kopplung von γ -Globulin (SAUNDERS und BARTLETT, 1977; ACKERMAN und CHESBRO, 1981) oder isoliertem IgG (KOPER et al., 1980; BÜNING-PFAUE et al., 1981; van der OUDERAA und HAAS, 1981; FREED et al., 1982; OLSVIK et al., 1982; NOTERMANS et al., 1983a; FEY et al., 1984; LOHNEIS, 1984; NOTERMANS et al., 1984b) an Meerrettichperoxidase (HRPO) bzw. alkalische Phosphatase - ALP - (FEY et al., 1984) hergestellt und bis zur Verwendung bei 4 °C oder - 20 °C gelagert. Nach Zusatz des Konjugates wurde bei den Sandwich-Verfahren i.a. unter den gleichen Bedingungen wie nach Zugabe der Probe (s.o.) inkubiert, nur vereinzelt (z.B. FREED et al., 1982; FEY et al., 1984) etwas kürzer.

Als colorigene Substrate für die anschließende Bestimmung der Enzymaktivität wurden 2,2-Azino-bis-(3-ethyl-benzathiazolin-6-Sulfonsäure). $(\text{NH}_4)_2$ -salz (ABTS), 5-Aminosalicylsäure (5-AS) oder o-Phenylendiamin (OPD) bei

HRPO bzw. p-Nitro-phenylphosphat (NPP) bei ALP eingesetzt (s. Übersicht 13). Der Farbumschlag wurde nach Stoppen der Substratreaktion oder ohne Stoppen nach einer Reaktionszeit von 30 bzw. 60 min (FEY et al., 1984) im Spektralphotometer gemessen (s. Übersicht 13).

Für die Untersuchungen wurden i.d.R. Lebensmittelextrakte gewonnen.

Hierfür kamen überwiegend stark abgekürzte Modifikationen der von CASMAN und BENNETT (1965), READ et al. (1965) sowie REISER et al. (1974) für die Prüfung von Lebensmitteln im Gel-Diffusionstest entwickelten Methoden zur Anwendung. Diese bestanden insbesondere aus Homogenisation des Lebensmittels sowie Abtrennung fester Bestandteile bzw. Lebensmittelproteine und -lipide (Säurefällung, Chloroformextraktion, Zentrifugation). Auf eine Konzentrierung der Lebensmittelextrakte wurde im Hinblick auf die hohe Empfindlichkeit der EIA (s.a. Übersicht 12) fast immer verzichtet. NOTERMANS, dessen Arbeitsgruppe zuvor meist eine Konzentrierung vornahm (KOPER et al., 1980; BÜNING-PFAUE et al., 1981; NOTERMANS et al., 1983a), empfahl diesen Schritt zuletzt (1984) nur bei Lebensmitteln mit geringer Wasseraktivität (z.B. Rohwurst, Käse), für die bei der Extraktion größere Mengen Flüssigkeit erforderlich seien. In Übersicht 14 sind die bisher in der Literatur für Enzym-Immunmethoden beschriebenen Extraktionsverfahren zusammengefaßt.

Unspezifische Reaktionen mit toxinfreiem Lebensmittelextrakt wurden von STIFFLER-ROSENBERG und FEY (1978), KAUFFMAN (1980) und NOTERMANS (1984) beschrieben. Der letztere wies auf eine nicht-immunologische Bindung durch Extrakte bestimmter Chargen von Krabben und Muscheln hin, welche allerdings durch Lagerung der Extrakte bei -20°C erheblich herabgesetzt wurde. Die von SAUNDERS und BARTLETT (1977) diskutierte mögliche Störung der EIA durch aus Lebensmitteln stammende proteolytische Enzyme konnte von SIMON (1978) und NOTERMANS (1984) nicht bestätigt werden.

Übersicht 14: Extraktionsverfahren für den enzymimmunologischen Nachweis
von Staphylokokken-Enterotoxinen aus Lebensmitteln

AUTOR (EN)	Extraktionsmittel	Extraktionsschritte						
		1	2	3	4	5	6	7
SAUNDERS und BARTLETT (1977)	NaCl+0,5%Tween80	h. ¹⁾	pH 8,0					
SIMON und TERPLAN (1977)			Extraktion nach REISER et al. (1974)					
MORIITA und WOODBURN (1978)	Phosphat-Puffer	h.	z. ²⁾	dialysieren				
SIMON (1978)			(abgekürzte) Extraktion nach REISER et al. (1974)					
STIFFLER-ROSENBERG und FEY (1978)			abgekürzte Extraktion nach REISER et al. (1974)					
KOPER et al. (1980)	PBS	h.	pH 7,2	z.	pH 4,3	CHCl ₃ -Extraktion	z.	(konzentrieren)
KAUFFMAN (1980)	PBS ³⁾	h.	z.	filtrieren	pH 4,5	z.	pH 7,4	(filtrieren)
ACKERMAN und CHESBRO (1981)	Tham CaCl ₂ -Puffer	h.	z.	filtrieren				
BÜNING-PFAUE et al. (1981)			(abgekürzte) Extraktion nach CASMAN und BENNETT (1965) bzw. REISER et al. (1974)					
FREED et al. (1982)	H ₂ O	h.	pH 4,5	z.	pH 7,5	CHCl ₃ -Extraktion	z.	filtrieren
NOTERMANS (1983)	H ₂ O	h.	z.	pH 4,5	z.	pH 7,2		
	H ₂ O	h.	pH 4,5	z.	pH 7,2	z.		
NOTERMANS et al. (1983a)	Aqua dest.	h.	pH 4,5	z.	pH 7,2	(z.)		
FEY et al. (1984)			abgekürzte Extraktion nach REISER et al. (1974)					
LOHNEIS (1984)	PBS	h.	z.	pH 4,5	z.	pH 7,2	z.	
NOTERMANS (1984)	Aqua dest.	h.	z.					
NOTERMANS et al. (1984b)	PBS	h.	z.					

¹⁾ homogenisieren

²⁾ zentrifugieren

³⁾ Tris (hydroxymethyl)-amino-methan

2.2.2.3 Interferenzen durch Staphylokokken-Protein A

Von größerer Bedeutung sind die bei der Untersuchung von *S. aureus*-Kulturfiltraten oder künstlich mit hohen *S. aureus*-Zahlen ($3,3 \times 10^7$ /ml) beimpften Lebensmitteln (KOPER et al., 1980) mit der Sandwich-Technik wiederholt registrierten falsch-positiven Resultate (NOTERMANS et al., 1978; NOTERMANS und KOPER, 1979; KOPER et al., 1980; LEE und SILVERMAN, 1981; BERDAL et al., 1981; FEY, 1982; FREED et al., 1982; NOTERMANS et al., 1982). Hierfür ist das von nahezu allen *S. aureus*-Stämmen (FORSGREN, 1970; LACHIA et al., 1979; u.a.) synthetisierte und zumeist sowohl in zellwandgebundener als auch gelöster Form vorliegende Staphylokokken-Protein A (SPA) verantwortlich. Das auffallend gestreckte SPA-Molekül besteht aus einer Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von etwa 42.000 D (BJÖRK et al., 1972) und ist vermutlich über den C-terminalen Teil (GUSS et al., 1984) kovalent an die Peptidoglycan-Struktur der Bakterienzellwand gebunden (SJÖQUIST et al., 1972), während der N-terminale Teil vier oder fünf sich wiederholende homologe IgG-bindende Einheiten aufweist (SJÖDAHL, 1977a und 1977b). SPA ist aber in der Lage, auch andere Immunglobuline fast aller Säugerspezies (BENNEL und WATSON, 1980; INGANÄS et al., 1980) durch Interaktion mit deren Fc-Teil zu binden. Der Grad der Reaktivität zwischen SPA und den Immunglobulinen variiert zum einen entsprechend deren Herkunft, zum anderen ergeben sich Unterschiede zwischen den einzelnen Immunglobullinklassen und -unterklassen (LANGONE, 1982). Aus den in der Übersicht 15 zusammengefaßten Angaben und den Ergebnissen von LIVE und RANU (1968), KRONVALL et al. (1970), LIND et al. (1970), KESSLER (1976), GOUDSWAARD et al. (1978) sowie BENNEL und WATSON (1980) kann z.B. gefolgert werden, daß der Anteil der SPA-reaktiven Immunglobuline in den Seren bzw. dem Kolostrum (BENNEL und WATSON, 1980) von nicht-immunisierten Schafen sehr gering, in den Seren von Kaninchen und Menschen aber sehr hoch ist. Von den Immunglobulinen des Schafes wird im übrigen IgG₂ deutlich besser

Übersicht 15: Bindung von Immunglobulinklassen und -unterklassen an Protein A bei verschiedenen Säugerspezies (nach GODING, 1978; modifiziert)

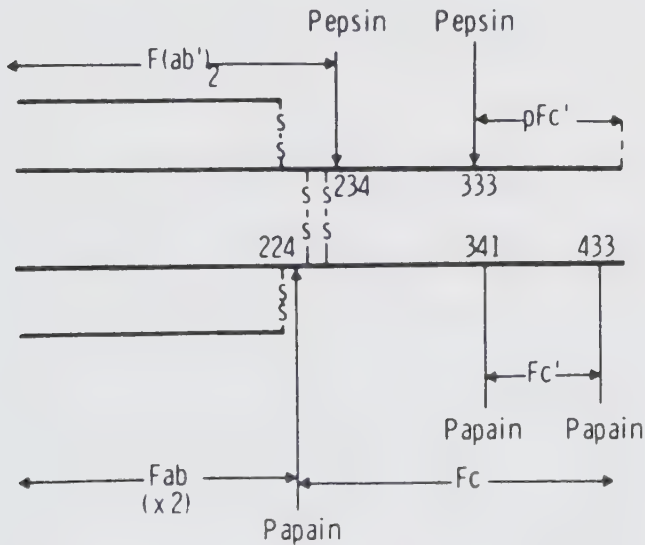
Säugerspezies	Bindende Immunglobulinklassen und -unterklassen	AUTOR(EN)
Mensch	G 1, 2, 4 A 2 z.T. IgM	HJELM (1975) SALTVEDT und HARBOE (1976) "
Kaninchen	IgG z.T. IgM	GODING (1976b) GODING (1976a)
Maus	G 2a, G 2b, G 3 z.T. G 1	KRONVALL et al. (1970) MACKENZIE et al. (1977) GODING (1978) MACKENZIE und WARNER (1977)
Schaf	G 2	KESSLER (1976)
Ziege	IgG	"
Ratte	IgG	KRONVALL et al. (1970) GODING (1978)
Meerschweinchen	G 1, G 2	FORSGREN (1968)

gebunden als IgG₁, während den anderen Immunglobulinklassen in diesem Zusammenhang keine Bedeutung zuzukommen scheint (KRONVALL et al., 1970; LIND et al., 1970; KESSLER, 1976; GODING, 1978; GOUDSWAARD et al., 1978; BENNELL und WATSON, 1980).

Die Feststellung von FORSGREN und SJÖQUIST (1966), daß für die Inter-

aktion von SPA und IgG der Fc-Teil des IgG wesentlich ist, wurde später durch die Beobachtung ergänzt, daß die bei proteolytischer Spaltung (Papain, Pepsin) von IgG entstehenden $F(ab')_2$ -, pFc' - sowie Fc-Fragmente (Übersicht 16) nicht mit SPA reagierten (BENNICH und TURNER, 1969; STEWART et al., 1978). Auf dieser Tatsache aufbauend wurde von

Übersicht 16: Enzymatische Spaltung des IgG-Moleküls durch Pepsin und Papain (nach STENWORTH und TURNER, 1979)



NOTERMANS und KOPER (1979) empfahlen, den Sandwich-ELISA zum Nachweis von SE mit dem $F(ab')_2$ -Fragment des IgG durchzuführen. Für diesen Zweck wurde Anti-SEB-IgG (vom Kaninchen) mit Pepsin versetzt (KOPER et al., 1980), welches einerseits den Fc-Teil des IgG völlig hydrolysiert und andererseits das durch Spaltung des IgG entstehende $F(ab')_2$ -Fragment intakt läßt (HEIMER et al., 1967; BENNICH und TURNER, 1969). Nach FREED et al. (1982) soll die Empfindlichkeit des ELISA durch die

Verwendung von $(\text{Fab}')_2$ -Fragmenten allerdings nachteilig beeinflusst werden. Alternativen zur Ausschaltung der unerwünschten, durch SPA bedingten Reaktionen im Sandwich-ELISA sind die Vorbehandlung der zu untersuchenden Proben mit normalem Kaninchenserum (FEY et al., 1984) bzw. mit nach AVRAMEAS und TERNYNCK (1969) insolubiliisiertem Schweine-IgG zwecks Adsorption des SPA oder die Verwendung von Schaf-IgG anstelle von Kaninchen-IgG (Übersicht 17). Den vergleichenden Untersuchungen von FREED et al. (1982) sowie NOTERMANS et al. (1982) ist zu entnehmen, daß die Wahl des AK (Kaninchen- oder Schaf-IgG) für die Beschichtung der Festkörperphase keinen wesentlichen Effekt im Hinblick auf die Vermeidung falsch-positiver Resultate durch SPA hatte. Für diesen Zweck schien vielmehr die Verwendung von Schaf-IgG als Konjugat essentiell zu sein. NOTERMANS et al. (1982) schlossen aus den erzielten Ergebnissen, daß die Unterschiede bei Einsatz von Kaninchen- oder Schaf-IgG auf eine geringe Anzahl von SPA-Bindungsstellen bei Schaf-IgG sowie möglicherweise auf starke sterische Hindernisse, die von dem an das Schaf-IgG gekoppelten Enzym ausgehen, zurückzuführen seien. Letzteres Prinzip dürfte nach Ansicht dieser Autoren auch dazu beitragen, daß nach der "Glutaraldehyd-Methode" hergestellte Kaninchen-IgG Konjugate im Gegensatz zu den nach der "Perjodat-Methode" hergestellten erst bei recht hohen SPA-Konzentrationen falsch-positive Ergebnisse erbrachten; bei Einsatz der nach der "Glutaraldehyd-Methode" hergestellten Konjugate war allerdings die Empfindlichkeit des ELISA gegenüber SE deutlich herabgesetzt.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß bei den kompetitiven ELISA-Techniken keine Interferenzen durch SPA beobachtet wurden (KOPER et al., 1980; NOTERMANS, 1982; NOTERMANS et al., 1982; NOTERMANS, 1983; FEY et al., 1984; LOHNEIS, 1984). Der Grund dafür ist, daß sich SPA zwar an den Coating-AK anlagert, dabei aber weder die Bindung von nativem noch von enzymkonjugiertem Enterotoxin behindert (NOTERMANS, 1982).

Methode	AUTOR (EN)
Beschichtung der Festkörperphase mit $F(ab')_2$-Fragmenten Vorbehandlung der Proben mit normalem Kaninchen-IgG Verwendung von Schaf-IgG (Beschichtung der Festkörperphase und Konjugat) Vorbehandlung der Proben mit insolubilisiertem Schweine-IgG	KOPER et al. (1980) LEE und SILVERMAN (1981) FEY (1982) FEY et al. (1982) NOTERMANS (1982) BERDAL et al. (1981) FREED et al. (1982) FEY et al. (1984) BÜNING-PFAUE et al. (1981) van der OUDERAA und HAAS (1981) NOTERMANS (1982) NOTERMANS et al. (1982) NOTERMANS et al. (1983a) LOHNEIS (1984) NOTERMANS et al. (1984b) FEY (1982) FEY et al. (1982)

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Immunisierung von Kaninchen mit SEC₁ und Aufbereitung des Antiserums

3.1.1 Material

Als AG wurde in Anlehnung an BORJA und BERGDOLL (1967) sowie ENDE et al. (1983) gereinigtes SEC₁ verwendet, dessen bei 277 nm im Spektralphotometer (Beckman Instr., Mod. 25) gemessene Proteinkonzentration unter Berücksichtigung des von BORJA und BERGDOLL (1967) für SEC₁ angegebenen Extinktionskoeffizienten ($E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 12,1$) 1,49 mg/ml betrug. Dieses Material ergab bei Untersuchung im Objektträger-Gel-Diffusionstest (SOMMERFELD und TERPLAN, 1975) keine Kreuzreaktionen mit Anti-SEA, -SEB, -SED bzw. -SEE. Die Überprüfung der Reinheit in der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (DAVIES und STARK, 1970) zeigte, daß nur monomeres Material im Molekulargewichtsbereich von SEC₁ (ca. 30.000 D) vorlag.

Zur Immunisierung wurden sieben Kaninchen ("Neuseeländer-Hybriden") im Alter von 12 Wochen mit einem durchschnittlichen Lebendgewicht von 1,5 kg eingesetzt. Die Tiere wurden in Einzelkäfigbatterien gehalten, mit Standarddiät (Altromin) und Wasser ad libitum versorgt und vor Beginn der Immunisierung 4 Wochen milieuadaptiert. Die Untersuchung der Sera auf die Anwesenheit präzipitierender AK gegen SEA, SEB, SEC, SED bzw. SEE erbrachte stets ein negatives Resultat.

Die für die Durchführung der Gel-Diffusionsteste erforderlichen Referenzttoxine bzw. SE-Antisera stammten von der Fa. Serva (Heidelberg) oder aus hauseigener Produktion, die sonstigen Reagenzien und Chemikalien (p.A. Qualität) - sofern nicht ein anderer Hersteller aufgeführt wird - von der Fa. Merck.

3.1.2 Methodik

Die Immunisierung erfolgte in Anlehnung an die Methode von RICHTER und KARSCH (1980). Dazu wurde lyophilisiertes SEC₁ in phosphatgepufferter Kochsalzlösung-pH 7,2 (0,02 mol/l NaCl + 0,02 mol/l Na₂HPO₄) gelöst und verdünnt (2,5 µg, 5 µg, 20 µg, 100 µg bzw. 400 µg SEC₁ pro ml). Die gelösten SEC₁-Präparationen wurden jeweils im Verhältnis 1 : 1 mit komplettem Freund'schen Adjuvans (Difco) versetzt und in aufsteigender Konzentration den Kaninchen in wöchentlichen Abständen subcutan in der Schultergegend appliziert. Nach einem Intervall von 6 Wochen wurde mit 1,7 mg geboostert. Vor der vierten Injektion und zwei Wochen nach der Boosterung erfolgte eine Blutentnahme. Nach einer 2-stündigen Gerinnungszeit bei 37 °C wurde das Blut über Nacht bei 4 °C gelagert, dann das Serum durch Zentrifugieren (20 min, 3000 U/min, 4 °C) gewonnen und zur Inaktivierung 30 min bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Das Serum wurde anschließend auf die Anwesenheit präzipitierender AK untersucht.

Zur Herstellung der für die weiteren Experimente erforderlichen γ-Globulinfraktion wurde abschließend das einen hohen Präzipitationstiter aufweisende Serum eines Kaninchens 1 : 1 mit Ammoniumsulfat versetzt und durch dreimalige Fällung gereinigt. Dabei kamen zwei Methoden zur Anwendung:

Methode I: 3-malige Präzipitation im Eisbad (30 min) und unter Rühren bei 4 °C (über Nacht) mit 2 mol/l Ammoniumsulfat

Methode II: 3-malige Präzipitation bei Raumtemperatur (4 h) mit 1,4 mol/l Ammoniumsulfat (HEBERT et al., 1973)

Anschließend wurde zentrifugiert (20 min, 3000 U/min, 4 °C), das Sediment resuspendiert und die Fällung zweimal wiederholt. Nach der letzten Fällung wurde das Zentrifugat in PBS gelöst (Ausgangsmenge des Serums) und solange gegen PBS dialysiert, bis das Außendialysat sulfatfrei war (Nachweis mit BaCl₂ unter leichter Ansäuerung). Der Proteingehalt des gefällten Serums wurde nach LOWRY et al. (1951) bestimmt, die verschiedenen Proteinfrak-

tionen in der Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (1953). Anschließend wurde das Serum zu je 2 ml portioniert und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Ergebnisse

Vor der vierten Toxininjektion ($100\text{ }\mu\text{g s.c.}$) lag bei zwei von sieben Kaninchen ein reziproker Präzipitationstiter von 1 vor, bei den restlichen Tieren konnten in der nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975) modifizierten OUCHTERLONY-Technik keine präzipitierenden AK nachgewiesen werden. Nach den folgenden Injektionen starben zwei der Tiere, bei den restlichen ergaben sich zwei Wochen nach der Boosterung reziproke Präzipitationstiter von 256 (Kaninchen 1-4) bzw. 1024 (Kaninchen 5).

Das gefällte Serum hatte einen Proteingehalt von ca. 10 mg/ml . Die Untersuchung des fraktionierten Antiserums in der Immunelektrophorese zeigte, daß die γ -Globulinfraction bei einer Fällung nach Methode II in einem höheren Reinheitsgrad gewonnen werden konnte.

3.2 Enzymmarkierung von Anti- SEC_1 -Kaninchen-Immunglobulin

3.2.1 Material

Zur Herstellung des Enzym-AK-Konjugates wurde Meerrettichperoxidase - HRPO - (Boehringer, 413470), Natrium (Na)-Perjodat (Sigma, S 1878), Na-Borohydrid (Sigma, S 9125) und das nach der Methode von HEBERT et al. (1973) gewonnene Anti- SEC_1 - γ -Globulin (siehe 3.1) verwendet. Bei dem bovinen Serumalbumin (BSA) handelte es sich um ein Produkt der Fa. Sigma (A 8022). Die Chemikalien für den Na-Acetat- bzw. Na-Carbonatpuffer sowie phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) stammten von der Fa. Merck (p.A. Qualität). PBS-pH 7,2 hatte folgende Zusammensetzung:

Na-Phosphat $0,012\text{ mol/l}$

NaCl $0,12\text{ mol/l}$

Die Abtrennung des Konjugates erfolgte durch Gelfiltration an Sephacryl S-200 superfine (Pharmacia, 17-0871-01). Die Packung der Säule wurde mit Cytochrom C (Serva, 18020) überprüft.

Als Eichproteine dienen:

γ -Globulin aus Kaninchenserum (Serva, 22540):	MG 150.000 D
Albumin aus Rinderserum (Serva, 11920):	MG 67.000 D
Albumin aus Hühnerei (Serva, 11840):	MG 45.000 D
Chymotrypsinogen A (Serva, 17200):	MG 25.000 D

3.2.2 Methodik

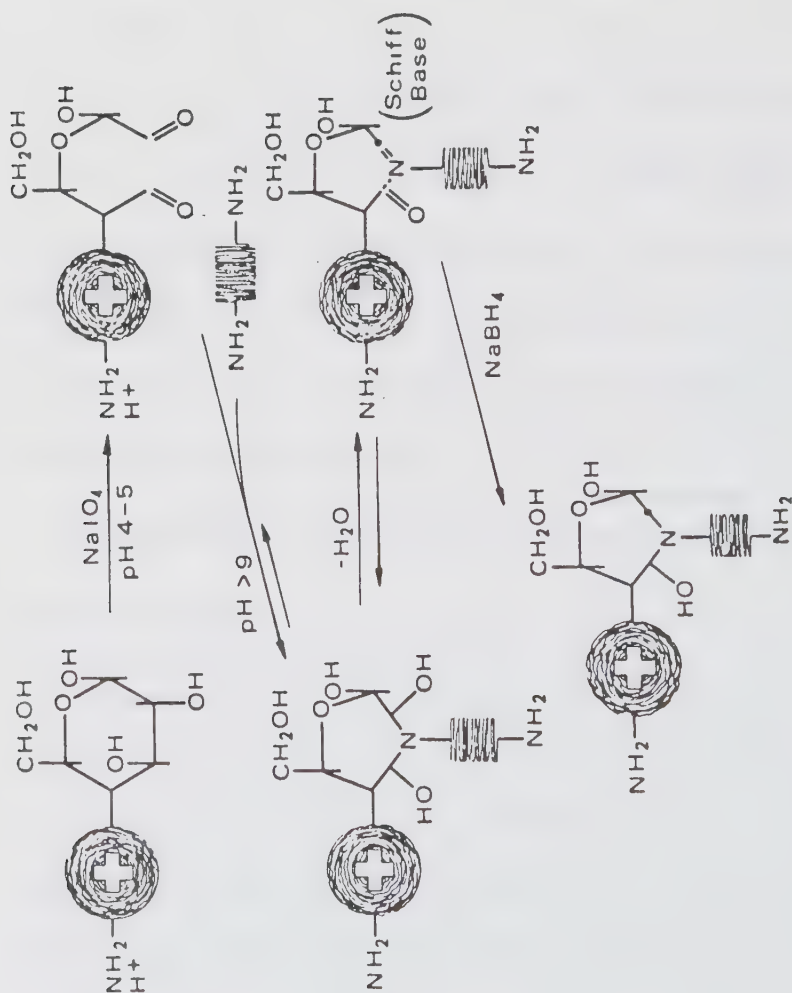
Die Kopplung wurde nach der Methode von WILSON und NAKANE (1978) durchgeführt, bei der Enzym und AK in Form einer Schiff'schen Base aneinander gebunden werden (Abb. 1).

Das Konjugat wurde wie folgt hergestellt:

- 4 mg HRPO in 1 ml Aqua dest. lösen,
- 0,2 ml frisch hergestellte 0,1 mol/l Na-Perjodatlösung zugeben und 20 min bei Raumtemperatur rühren (Farbumschlag nach grün!),
- HRPO-Aldehyd über Nacht bei 4 °C gegen 1 mmol/l Na-Acetatpuffer-pH 4,4 dialysieren,
- pH des HRPO-Aldehyd durch Zugabe von 20 μ l 0,2 mol/l Na-Carbonatpuffer-pH 9,5 auf 9-9,5 anheben und sofort mit 8 mg Immunglobulin (in 0,01 mol/l Na-Carbonatpuffer-pH 9,5) reagieren lassen, 2 h bei Raumtemperatur rühren,
- 0,1 ml frisch hergestellte Na-Borhydridlösung (0,11 mol/l) zugeben und 2 h bei 4 °C stehenlassen.

Da das Reaktionsgemisch neben dem Kopplungsprodukt auch ungebundene Immunglobuline und HRPO-Aldehyd enthielt, wurden die einzelnen Komponenten durch Gelchromatographie voneinander getrennt. Dazu wurde eine Säule nach Vorschrift des Herstellers mit Sephacryl S-200 superfine gepackt

Abb. 1: Reaktionsablauf bei der Kopplung von HRPO an Protein
(nach WILSON und NAKANE, 1978)



und mit PBS-pH 7,2 äquilibriert. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden dann je 5 mg Eichprotein in insgesamt 1 ml PBS gelöst, auf die Säule aufgetragen, mit einer Flußrate von 10 ml/h eluiert und in Fraktionen zu 5,7 ml gesammelt.

Unter den gleichen Bedingungen wurde das Reaktionsgemisch über die Säule aufgetrennt, dann der Gesamtproteingehalt (bei 280 nm) und der HRPO-Gehalt (bei 403 nm) der einzelnen Fraktionen im Spektralphotometer gemessen und die jeweilige Reinheitszahl (RZ), die zur Bestimmung des optimalen Enzym-AK-Konjugates herangezogen wird (WILSON und NAKANE, 1978), anhand des Quotienten $\frac{E_{403 \text{ nm}}}{E_{280 \text{ nm}}}$ berechnet.

3.2.3 Ergebnisse

Die Auftrennung des Reaktionsgemisches nach der Gelchromatographie ist in Abbildung 2 dargestellt. Das Eluat der Fraktionen 28 bis 33 wies ein Molekulargewicht von ca. 200.000 D auf und enthielt enzymmarkiertes Anti-SEC₁-Kaninchen-Immunglobulin. In den Fraktionen 34 bis 39 war überwiegend Material mit einem Molekulargewicht von ca. 150.000 D vorhanden (nicht-markierte Immunglobuline), in den Fraktionen 44 bis 47 solches mit einem Molekulargewicht von ca. 40.000 D (freie HRPO). Die Eluate mit einem RZ-Wert zwischen 0,4 und 0,5 (Fraktionen 28-33) wurden gepoolt (Tab. 1), mit BSA (10 mg/ml Konjugat) versetzt, in Portionen zu je 0,2 ml abgefüllt und bis zum Gebrauch bei - 80 °C gelagert.

Abb. 2: Chromatographie des Kopplungsproduktes an Sephacryl
S-200 superfine

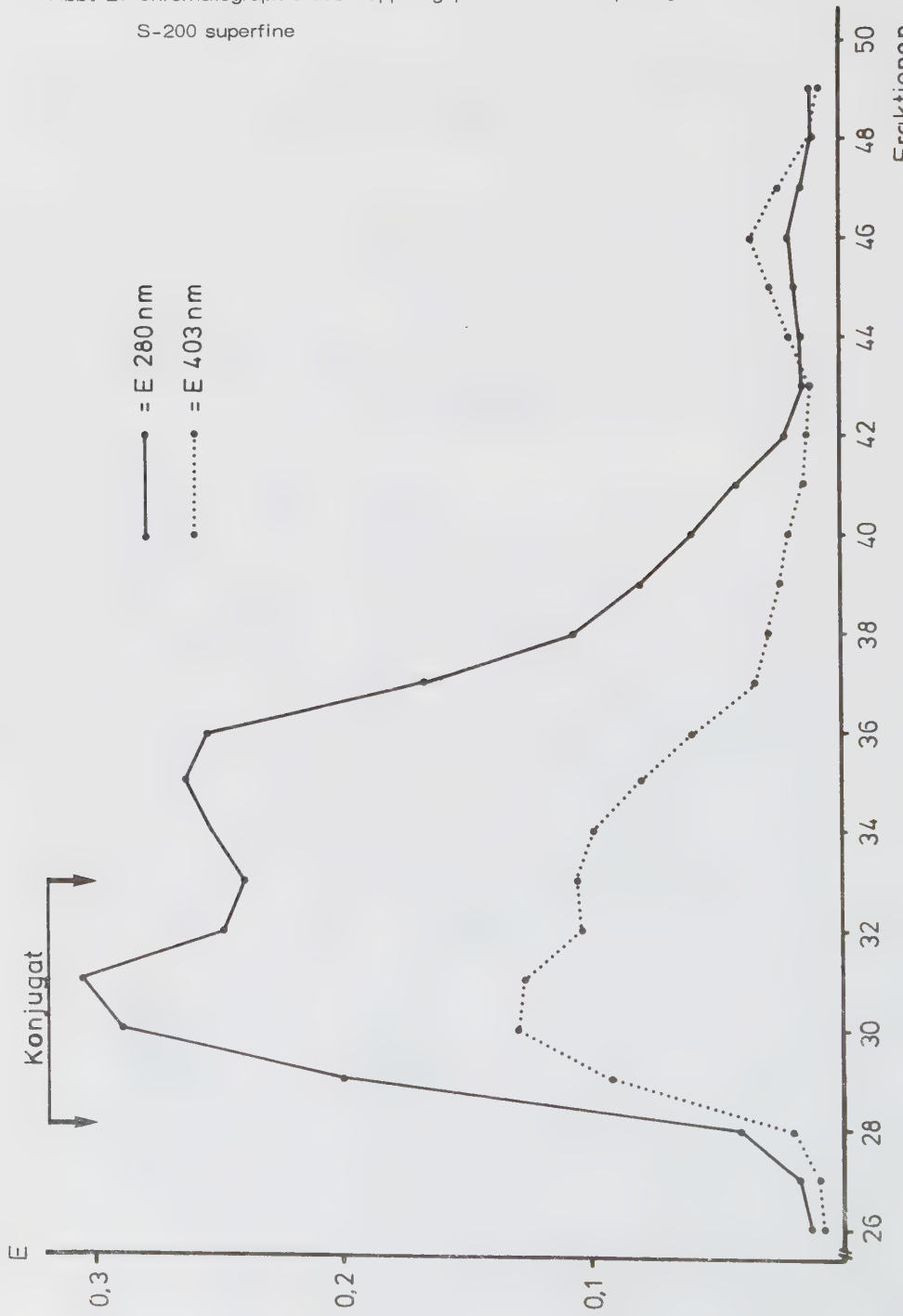


Tabelle 1: Bestimmung des optimalen Enzym-Antikörper-Konjugates
anhand des Quotienten $\frac{E_{403 \text{ nm}}}{E_{280 \text{ nm}}}$ (RZ)

Fraktion	$E_{280 \text{ nm}}$	$E_{403 \text{ nm}}$	RZ	gepoolte Konjugatfraktion
26	0,013	0,08	0,62	
27	0,018	0,010	0,56	
28	0,042	0,021	0,50	X
29	0,201	0,092	0,46	X
30	0,289	0,130	0,45	X
31	0,306	0,127	0,42	X
32	0,249	0,104	0,42	X
33	0,241	0,106	0,44	X
34	0,254	0,099	0,39	
35	0,264	0,81	0,31	
36	0,255	0,059	0,23	

3.3 Nachweis von SEC mittels Sandwich-ELISA

3.3.1 Material

Als Festkörperphase für die AK-haltige γ -Globulinfraktion (siehe 3.1) dienten Polystyrol-Mikrotiterplatten mit 8 x 12 Kavitäten (Nunc Immoplate I F mit Prüfzertifikat), die mit Hilfe von 12-Kanalpipetten (Titertek) mit den verschiedenen Reagenzien beschickt wurden. Die Inkubation mit AK erfolgte in einer mit nassen Papierhandtüchern ausgelegten, geschlossenen Metallkassette (feuchte Kammer), die Inkubation mit den anderen Reagenzien

auf einem Taumelgerät (Heidolph). Die Platten wurden mit einer halbautomatischen Waschvorrichtung (Miniwash, Dynatech) gespült, die Extinktion des Reaktionsprodukts im Autoreader gemessen (Micro-ELISA Autoreader MR 580, Dynatech).

Weiterhin wurden folgende Reagenzien verwendet:

- teilgereinigte (Fa. Serva) bzw. hochgereinigte (hauseigene) Enterotoxine der Typen A, B, C₁, C₂, D und E
- Konjugat (siehe 3.2)
- Substrat: ortho-Phenylendiamin (Sigma, P 3888)
- Stopreagens: 2,5 mol/l H₂SO₄
- BSA (Sigma, A 8022)
- Glutaraldehyd (Sigma, G 6257)
- H₂O₂ (30 %), stabilisiert (Merck, 8597)
- Tween 20 (Sigma, P 1379)
- 0,2 mol/l Natriumcarbonat-Bicarbonatpuffer-pH 9,6
- PBS-pH 7,2
- Substratpuffer (Phosphat-Zitratpuffer)-pH 5,0:
0,2 mol/l Na₂HPO₄ + 0,1 mol/l Zitronensäure
- NaCl und Na₂CO₃ (jeweils p.A. Qualität; Fa. Merck)

3.3.2 Herstellung des Immunosorbens

3.3.2.1 Methodik

Um den für die AK-Adsorption günstigsten Puffer bzw. die optimale Proteinkonzentration zu ermitteln, wurde Anti-SEC₁- δ -Globulin zum einen in PBS-pH 7,2, zum anderen in Natriumcarbonat-Bicarbonatpuffer-pH 9,6 gelöst und Verdünnungen mit einer Proteinkonzentration von 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 40, 60, 80 und 100 μ g/ml hergestellt. Die Kavitäten einer Mikrotiterplatte wurden mit jeweils 0,1 ml dieser Verdünnungen beschichtet (Vierfachansätze) und 3 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und über Nacht bei 4 °C

im Kühlschrank gelagert (nur Kavität A 1 blieb zwecks Messung des Blankwertes unbeschichtet). Nach Absaugen der AK-Pufferlösung und Absättigung freier Bindungsstellen mit PBS/BSA-Lösung (0,2 ml/Kavität) bei Zimmertemperatur (10 min) wurden die Platten zweimal gewaschen (0,15 mol/l NaCl + $4,2 \times 10^{-4}$ mol/l Tween 20). Danach wurde die Waschflüssigkeit abgesaugt und die Restflüssigkeit auf einem Stapel Papierhandtücher ausgeschlagen. Nach Zugabe von 0,1 ml in PBS-pH 7,2 gelöstem SEC₁ (1 µg/ml) und Beschichtung einzelner Kavitäten nur mit PBS (Leerwert) wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubiert. Danach wurden die Platten wie oben zweimal gewaschen, dann 0,1 ml Konjugat in einer Verdünnung (in PBS-pH 7,2) von 1: 600 pro Kavität zugegeben und erneut 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Taumler bebrütet. Es folgte ein dreimaliges Waschen, bevor 0,1 ml frisch hergestellte Substratlösung nach VOLLER et al. (1979) (ortho-Phenylendiamin (OPD) in Substratpuffer und Zusatz von H₂O₂ als Oxidationsmittel) pro Kavität zugegeben wurden und bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubiert wurde. Die Reaktion wurde nach 10 min mit 2,5 mol/l H₂SO₄ gestoppt (25 µl/Kavität) und die Extinktion des Reaktionsproduktes bei 490 nm im Autoreader gemessen. Der Einfluß von Inkubationszeit und -temperatur auf die AK-Bindung (Immunglobulinkonzentration: 10 µg/ml; Puffer: PBS-pH 7,2) wurde unter folgenden Bedingungen untersucht:

- a) 3-stündige Inkubation bei + 4 °C
- b) 18-stündige Inkubation bei + 4 °C
- c) 48-stündige Inkubation bei + 4 °C
- d) 18-stündige Inkubation bei + 37 °C
- e) 3-stündige Inkubation bei + 37 °C
und Lagerung über Nacht bei + 4 °C
- f) 30-minütige Inkubation bei + 37 °C

Alle anderen Parameter blieben mit Ausnahme der eingesetzten SEC₁-Konzentrationen (0,050 bis 1000 ng/ml) gegenüber der vorhergehenden Versuchsreihe unverändert.

Abschließend wurde untersucht, ob durch eine Vorbehandlung der Polystyrol-oberfläche eine bessere und stabilere AK-Bindung erreicht werden kann. Dazu kamen zwei Methoden zur Anwendung:

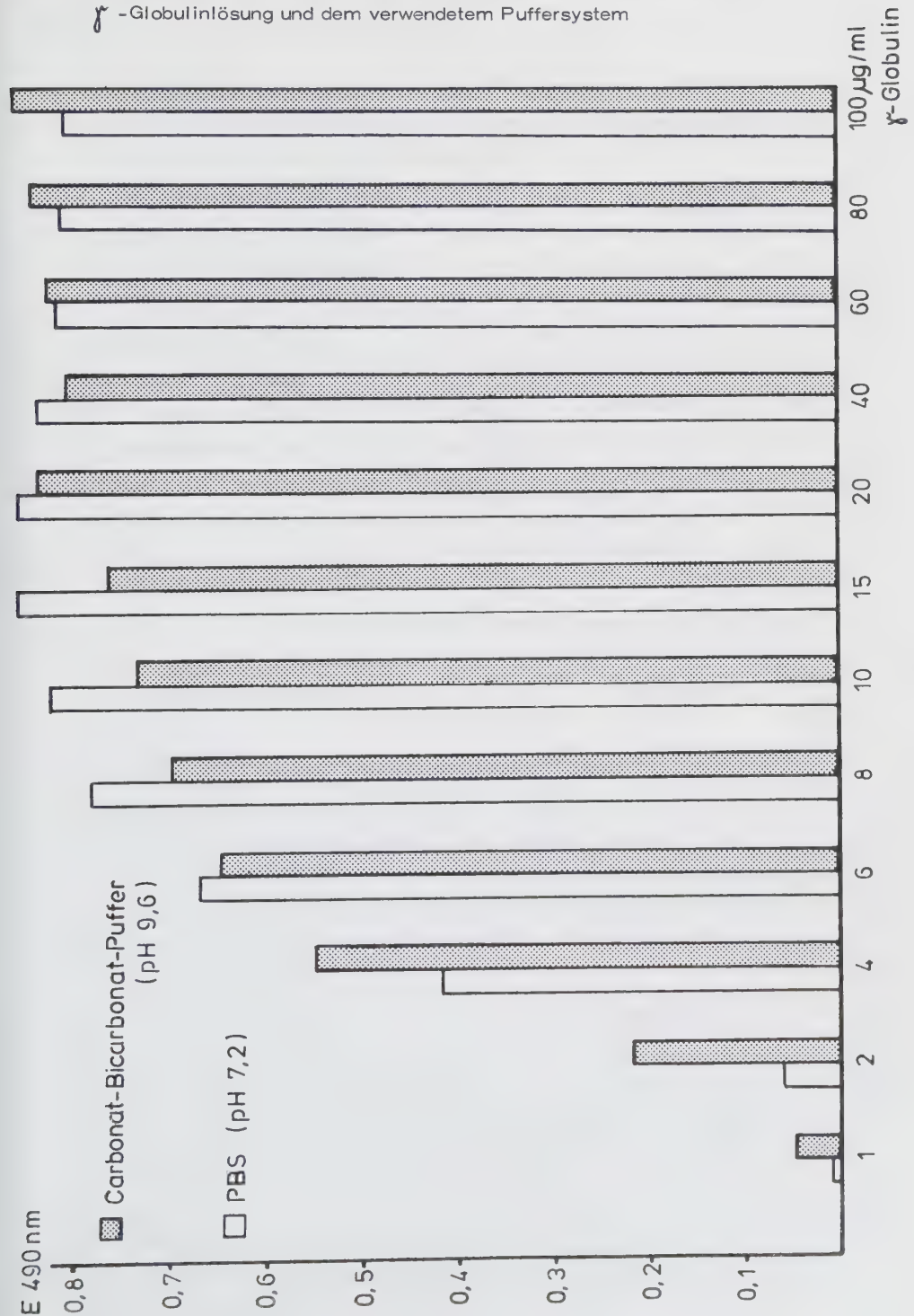
- a) Die Kavitäten einer Plattenhälfte (Reihe A-D) wurden in Anlehnung an die Methode von SAUNDERS und BARTLETT (1977) mit je 0,2 ml einer wäßrigen BSA-Lösung (3×10^{-6} mol/l) beschichtet und luftgetrocknet. Das Albumin wurde durch eine 30-minütige Reaktion mit 0,025 mol/l Glutaraldehyd in PBS fixiert.
- b) Nach HOWELL et al. (1981) wurden die Testplatten wie unter a) mit 0,4 ml wäßriger Glutaraldehydlösung (2,5 mol/l) in 100 ml 0,1 mol/l Na_2CO_3 -Puffer-pH 9,0 beschickt und 3 h bei 56°C inkubiert.

Nach dem Trocknen der Platten bzw. dem Abgießen der Glutaraldehydlösung wurde 4 mal mit A. dest. gewaschen, unter optimierten Bedingungen mit AK beschichtet (Immunglobulin: $10\text{ }\mu\text{g/ml}$; PBS-pH 7,2; 3-stündige Inkubation bei 37°C plus Lagerung über Nacht bei 4°C) und wie vorher ausgewertet. Als Kontrollen liefen die unvorbehandelten Plattenhälften (Reihe E-H) mit.

3.3.2.2 Ergebnisse

Die Abhängigkeit der AK-Adsorption von Proteinkonzentration und Puffersystem ist in Abb. 3 dargestellt. Eine Erhöhung der γ -Globulinkonzentration hatte bis $15\text{ }\mu\text{g/ml}$ eine - allerdings nur in den unteren Konzentrationsbereichen deutliche - Zunahme der an die Polystyroloberfläche gebundenen AK zur Folge. Bei noch höheren Konzentrationen ($20\text{--}100\text{ }\mu\text{g/ml}$) trat keine weitere Steigerung der adsorptiven Bindung ein. Insbesondere im Bereich von $1\text{--}4\text{ }\mu\text{g/ml}$, aber auch ab $60\text{ }\mu\text{g/ml}$ war die Bindung besser, wenn Natriumcarbonat-Bicarbonatpuffer-pH 9,6 als Lösungsmittel verwendet wurde, im dazwischen liegenden Bereich erwies sich PBS-pH 7,2 als effektiver. Aufgrund dieser Ergebnisse und im Hinblick auf die Praktikabilität wurde bei den weiteren Versuchen mit einer Immunglobulinkonzentration von $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ gearbeitet und der AK jeweils in PBS-pH 7,2 gelöst.

Abb. 3: Abhängigkeit der Antikörperadsorption von der Konzentration der γ -Globulinlösung und dem verwendeten Puffersystem



Die Untersuchung unterschiedlicher Inkubationszeiten und -temperaturen zeigte, daß die beste AK-Adsorption bei 3-stündiger Inkubation im Brutschrank (37°C) und anschließender Lagerung über Nacht im Kühlschrank (4°C) erfolgte (Abb. 4). Andere Bedingungen erbrachten z.B. bei den $1000\text{ ng SEC}_1/\text{ml}$ enthaltenden Proben eine um 12 % (48 h, 4°C), 15 % (18 h, 4°C), 25 % (3 h, 4°C , 18 h, 37°C) bzw. 28 % (30 min, 37°C) niedrigere Bindungsrate.

Die Vorbehandlung der Polystyroloberfläche nach SAUNDERS und BARTLETT (1977) erbrachte eine um über 90 % verminderte Bindung der AK im Vergleich zur unvorbehandelten Plattenhälfte. Bei der Vorbehandlung der Kunststoffoberfläche nach HOWELL et al. (1981) konnten demgegenüber im Vergleich zur Kontrolle ca. 6 % mehr AK gebunden werden. Auf diesen zusätzlichen Arbeitsschritt wurde im Hinblick auf den relativ geringen Effekt bei den weiteren Experimenten verzichtet.

3.3.3 Ermittlung der optimalen Konjugatverdünnung

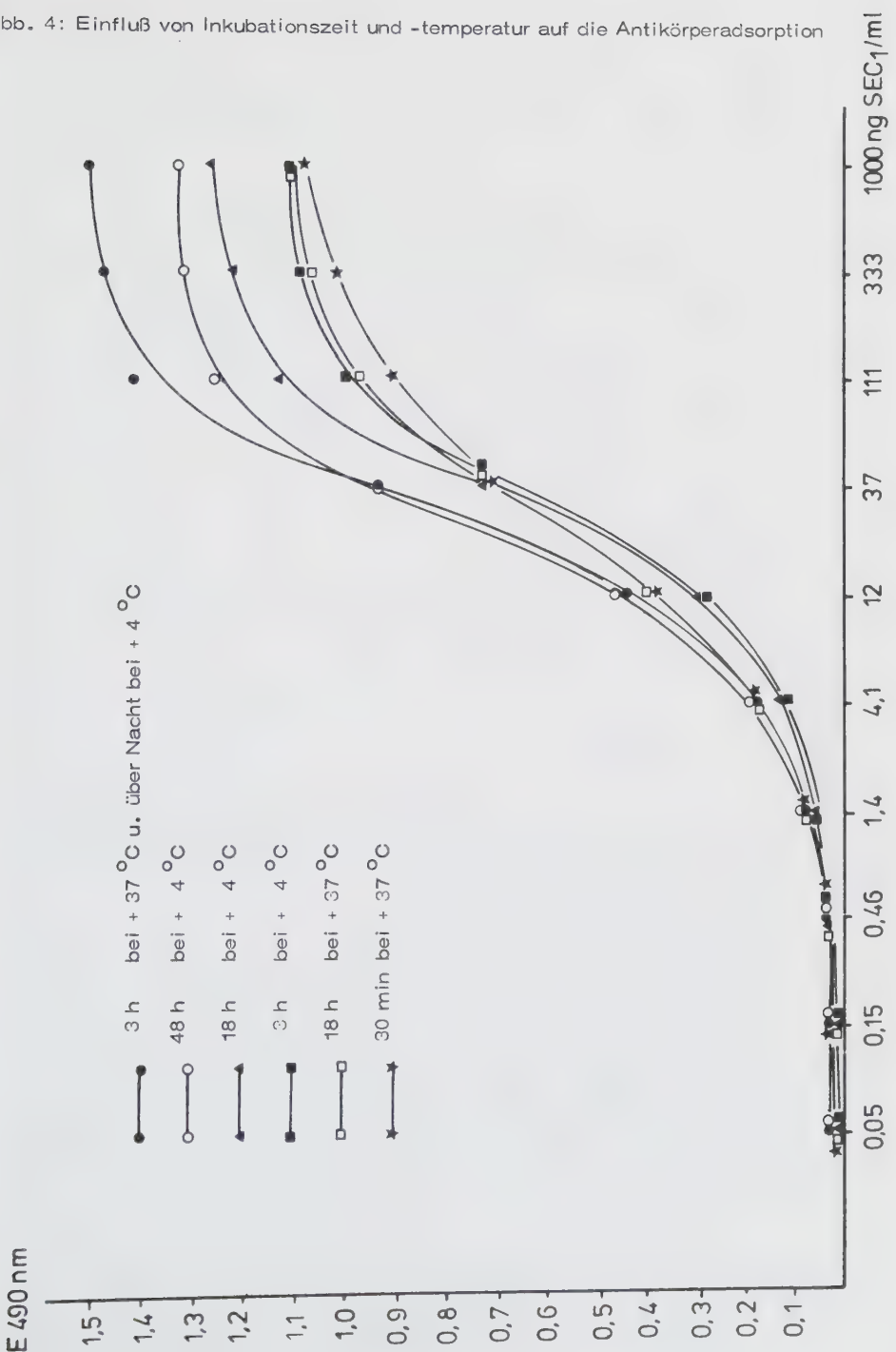
3.3.3.1 Methodik

Im Hinblick auf eine weitere Beschleunigung des gesamten Untersuchungsganges wurden die Inkubationszeiten nach Zugabe des SEC_1 sowie des Enzymkonjugates auf jeweils 30 min (statt jeweils 60 min) bzw. nach Zusatz des Substrates auf 4 min (statt 10 min) gesenkt. Um die dafür geeignete Konjugatverdünnung zu ermitteln, wurden AK-beschichtete Testplatten mit den Konjugatverdünnungen 1 : 400, 1 : 600, 1 : 800 bzw. 1 : 1000 inkubiert.

3.3.3.2 Ergebnisse

Der Vergleich verschiedener Konjugatverdünnungen bei vorgegebener Konjugat- und Substratinkubationsdauer zeigte, daß bei einer Arbeitsverdünnung von 1 : 400 der lineare Meßbereich des Photometers (bis 1,5 Absorptions-

Abb. 4: Einfluß von Inkubationszeit und -temperatur auf die Antikörperadsorption



einheiten) am besten genutzt werden konnte (Abb. 5; Tab. 2). Hieraus resultiert, daß die Auswertung bei dieser Konjugatverdünnung am präzisesten ist.

Tabelle 2: Nutzung des linearen Meßbereiches des Photometers in Abhängigkeit von der Konjugatverdünnung

Konjugatverdünnung	Nutzungsgrad (%) bei $1 \mu\text{g/ml SEC}_1$
1 : 400	96
1 : 600	78
1 : 800	55
1 : 1000	48

3.3.4 Optimierung der Enzymbestimmung

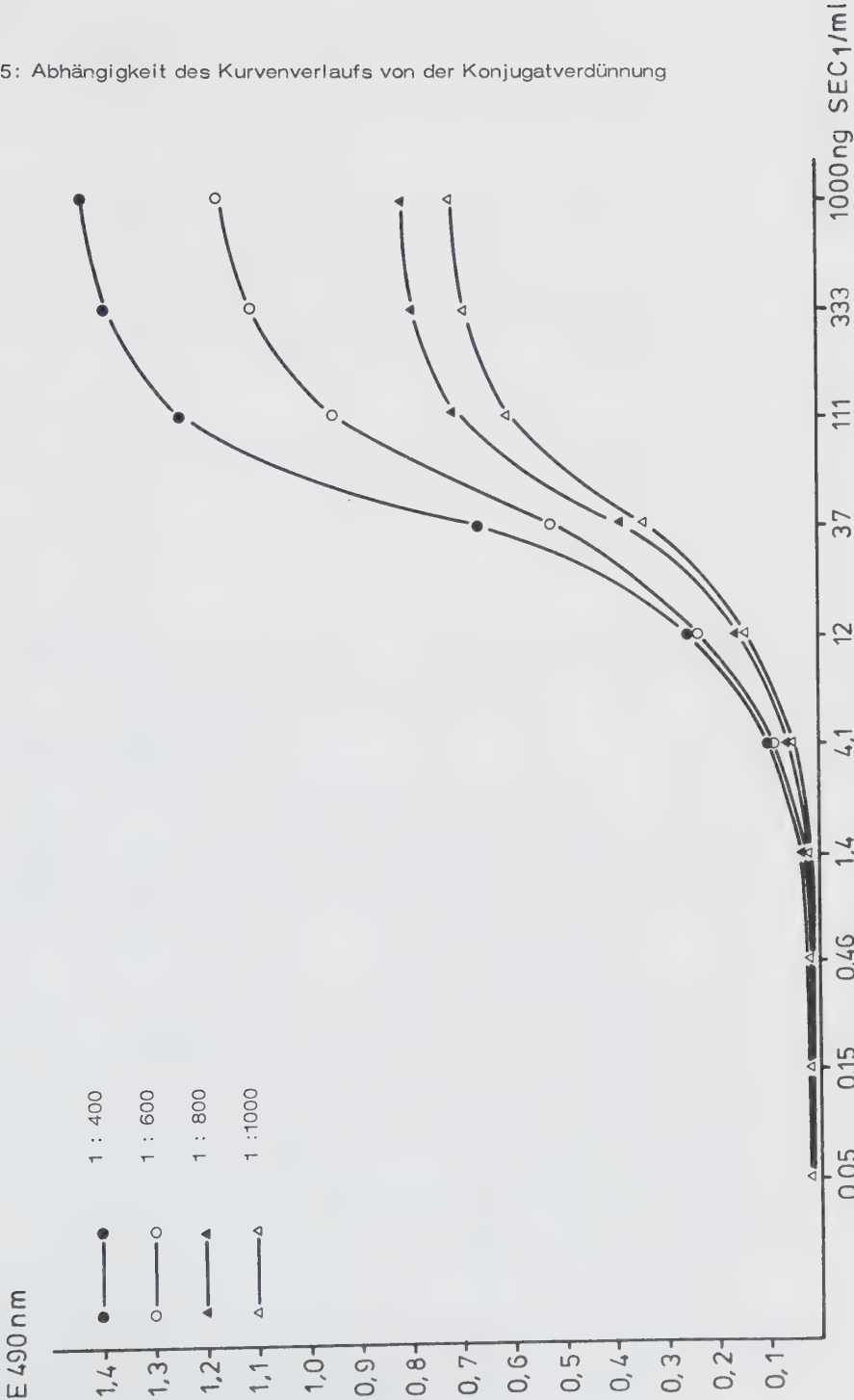
3.3.4.1 Methodik

In der Reihe A-D und E-H einer Testplatte wurden zwei, ortho-Phenylendiamin (OPD) und H_2O_2 in unterschiedlichen Konzentrationen enthaltende Substratlösungen miteinander verglichen:

- Substratlösung nach VOLLER et al. (1979):
Substratpuffer mit 4 mmol/l OPD und 3,5 mmol/l H_2O_2 ;
- Substratlösung nach GALLATI und BRODBECK (1982):
Substratpuffer mit 15 mmol/l OPD und 5 mmol/l H_2O_2 .

Der sonstige Testablauf entsprach prinzipiell dem in Abschnitt 3.3.2.1, allerdings wurden die aufgrund der anschließenden Experimente erforderlichen Verbesserungen (s. Abschnitte 3.3.2.2, 3.3.3.2) berücksichtigt.

Abb. 5: Abhängigkeit des Kurvenverlaufs von der Konjugatverdünnung



3.3.4.2 Ergebnisse

Abb. 6 zeigt, daß die Empfindlichkeit des ELISA bei Verwendung der Substratlösung nach GALLATI und BRODBECK (1982) und einer Reaktionsdauer von 4 min deutlich besser war als bei Einsatz der geringere Mengen OPD und H_2O_2 enthaltenden Substratlösung nach VOLLER et al. (1979). Für die weiteren Versuche wurde daher die Substratlösung nach GALLATI und BRODBECK (1982) benutzt.

3.3.5 Standardisierung

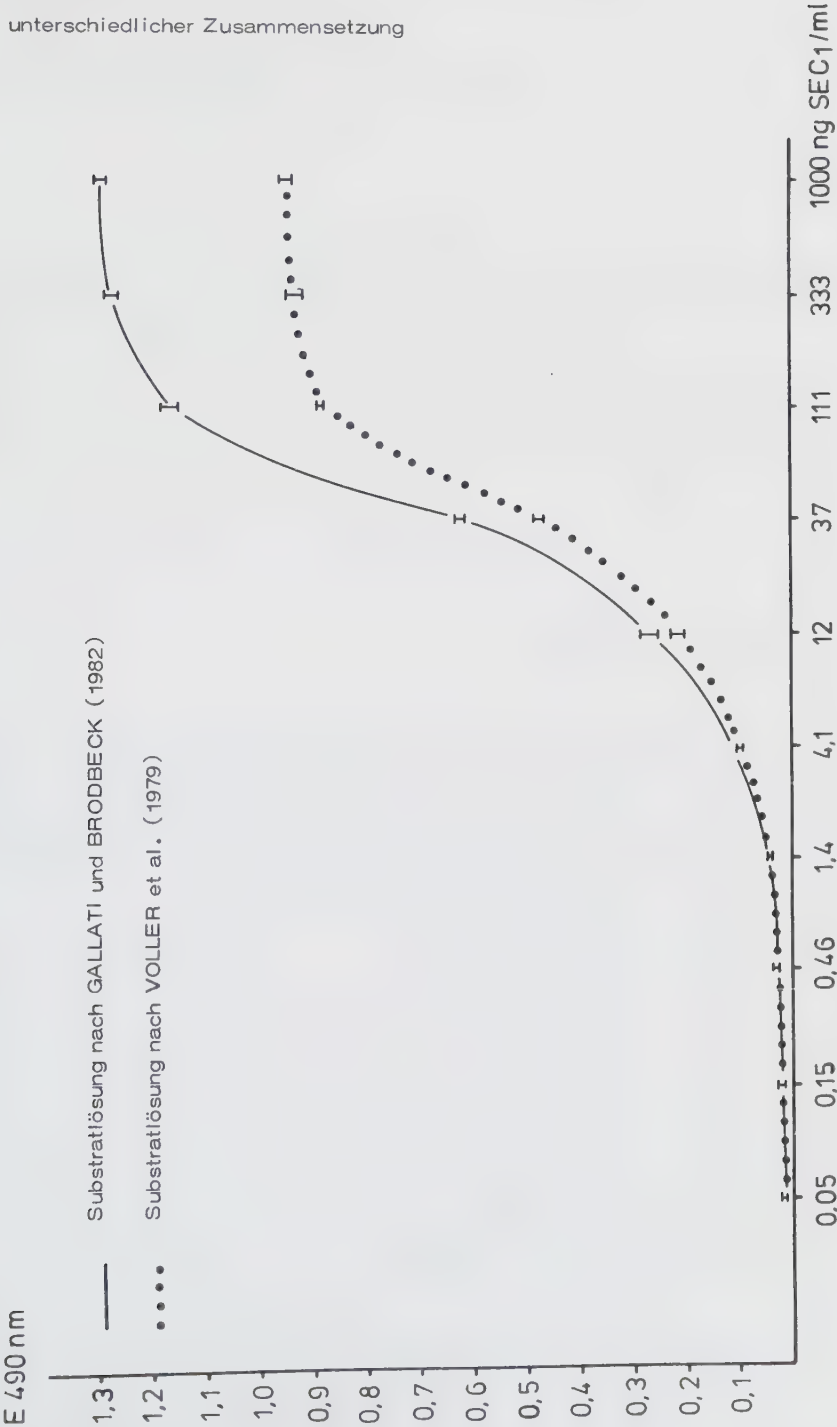
3.3.5.1 Methodik

Aufgrund der in den aufgeführten experimentellen Vergleichen erzielten Daten wurde der ELISA-Test mit gereinigtem, in PBS-pH 7,2 gelöstem SEC_1 haus-eigener Herstellung unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Beschichtung der Testplatte mit 0,1 ml in PBS-pH 7,2 gelöstem Anti- SEC_1 - γ -Globulin ($10 \mu g/ml$) pro Kavität; anschließend 3-stündige Inkubation bei $37^\circ C$ und Lagerung über Nacht bei $4^\circ C$;
- Absättigung freier Bindungsstellen (10 min mit $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol/l PBS-BSA}$);
- Beschickung mit 0,1 ml in PBS-pH 7,2 gelöstem SEC_1 /Kavität und 30 min Inkubation bei Raumtemperatur;
- Zugabe von 0,1 ml Konjugatverdünnung 1 : 400 pro Kavität und 30 min Inkubation bei Raumtemperatur;
- Zusatz von 0,1 ml Substratlösung nach GALLATI und BRODBECK (1982) und 4 min Inkubation bei Raumtemperatur;
- Stoppen der Reaktion mit $2,5 \text{ mol/l } H_2SO_4$ ($25 \mu l/Kavität$) und Messung des Reaktionsproduktes bei 490 nm im Autoreader.

Nach Absättigung, SEC_1 -Zugabe und Konjugatzusatz wurden die Platten zwei- bzw. dreimal gewaschen (s.a. Abschnitt 3.3.2.1). Um Fehler beim Pipettieren zu vermeiden, wurden die bei Kühlschranktemperaturen gelagerten

Abb. 6: Messung der enzymatischen Aktivität mit Substratlösungen unterschiedlicher Zusammensetzung



Reagenzien vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur angewärmt.

3.3.5.2 Ergebnisse

Der Verlauf der aus den arithmetischen Mittelwerten der Proben (jeweils 6 Parallelwerte) ermittelten SEC_1 -Standardkurve ist in Abb. 7 dargestellt. Als SEC_1 -Nachweisgrenze wurde der Extinktionswert angesehen, der mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ ($= 2,58$ -fache Standardabweichung) über dem mittleren Leerwert lag ($\bar{x} + 2,58 s$). Aus dieser Festlegung ergab sich eine Nachweisgrenze für in PBS-pH 7,2 gelöstes SEC_1 von 50 pg/ml.

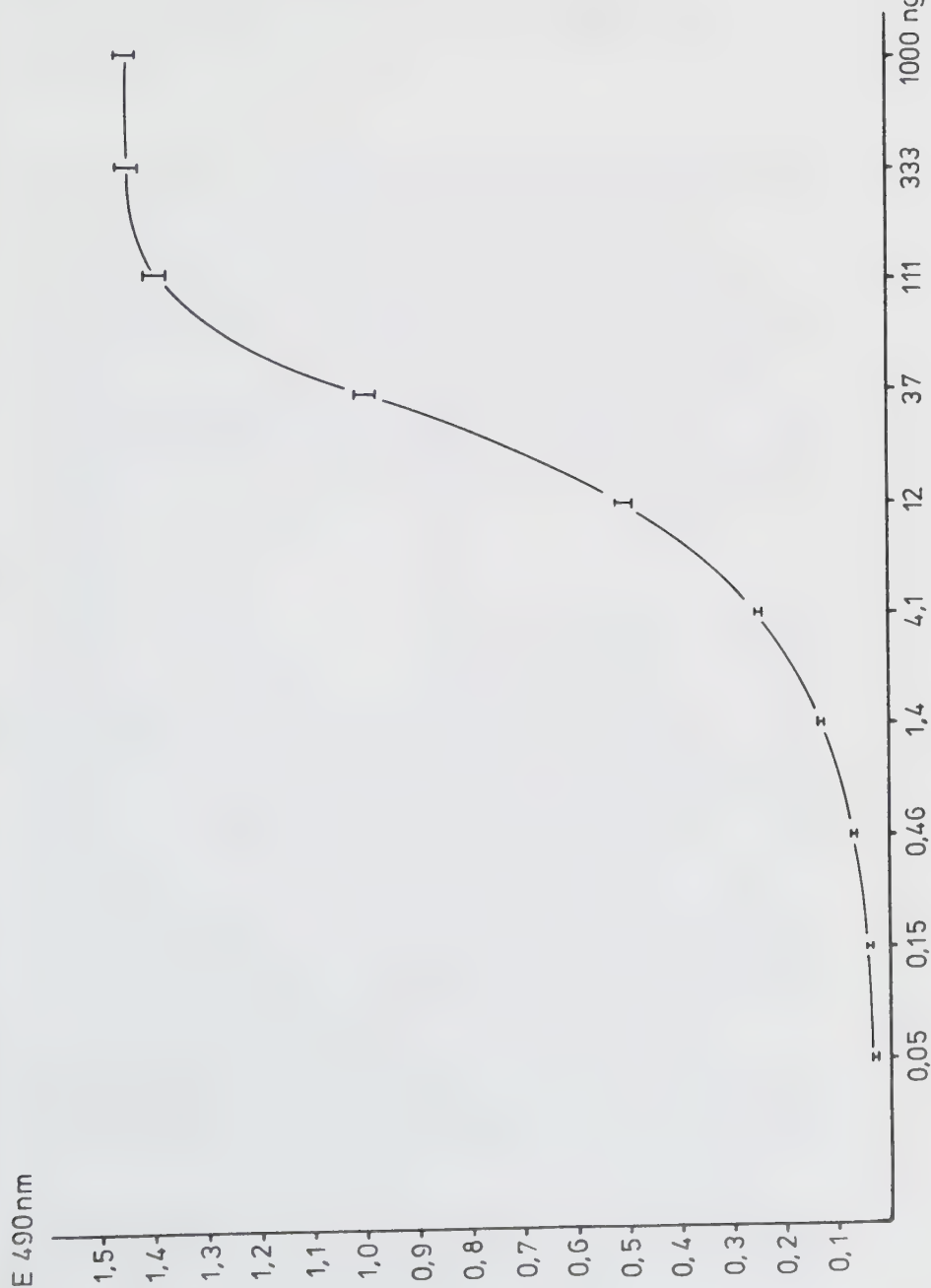
3.3.6 Untersuchungen zur Spezifität

3.3.6.1 Methodik

Um die Spezifität des Testsystems für SEC zu ermitteln, wurden Untersuchungen mit teil- bzw. hochgereinigten SE angestellt. Folgende SE-Typen wurden mit PBS auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt und entsprechend Abschnitt 3.3.5 zu je 0,1 ml in die Kavitäten einer mit Anti- SEC_1 - γ -Globulin beschichteten Testplatte pipettiert:

- a) SEA (Serva, 35340)
- b) SEA (hauseigene Produktion)
- c) SEB (hauseigene Produktion)
- d) SEC_1 (Serva, 35342)
- e) SEC_1 (hauseigene Produktion)
- f) SED (Serva, 35344)
- g) SED (hauseigene Produktion)
- h) SEE (Serva, 35345)
- i) SEE (hauseigene Produktion)

Abb. 7: Standardkurve zum Nachweis von SEC_1



Außerdem wurde geprüft, ob mit dem für SEC_1 spezifischen AK auch SEC_2 (Serva, 35343) nachweisbar ist.

3.3.6.2 Ergebnisse

Der Tabelle 3 ist zu entnehmen, daß außer bei SEC_1 auch bei SED (Serva) sowie SEE (Serva) ein Substratumsatz gegeben war, allerdings deutlich geringer als bei SEC_1 . Dabei würde z.B. der Substratumsatz beim SED dem

Tabelle 3: Reaktion verschiedener SE-Typen mit Anti- SEC_1 - γ -Globulin

SE-Typ	Substratumsatz (%)
Leerwert (PBS)	1
SEA (Serva)	1
SEA (hauseigene Produktion)	1
SEB (hauseigene Produktion)	1
SEC_1 (Serva)	95
SEC_1 (hauseigene Produktion)	100
SED (Serva)	22
SED (hauseigene Produktion)	1
SEE (Serva)	8
SEE (hauseigene Produktion)	1

von ca. 10 ng SEC_1 /ml PBS entsprechen. Bei den hochgereinigten SE hauseigener Herstellung traten ebensowenig unspezifische Reaktionen auf wie beim teilgereinigten SEA von Serva. SEC_2 (Serva) ließ sich ebenfalls mit Anti-

SEC₁- γ -Globulin nachweisen, doch war das Bindungsvermögen deutlich (um ca. 60 %) herabgesetzt. Die Nachweisgrenze für SEC₂ lag bei etwa 2 ng/ml.

3.4 Beeinträchtigungen des SEC₁-Nachweises durch Staphylokokken-Protein A und Möglichkeiten zu deren Eliminierung

In der Literatur (s. Abschnitt 2.2.2.3) wurde darauf hingewiesen, daß es beim Nachweis von SE im Sandwich-ELISA aufgrund einer unspezifischen Bindung von Staphylokokken-Protein A (SPA) an den Fc-Teil des IgG-Moleküls zu falsch-positiven Reaktionen kommen kann. Es sollte daher geprüft werden, inwieweit dies auch für das eigene für SEC₁ entwickelte Testsystem (s. Abschnitt 3.3.5) zutrifft und welche der zur Ausschaltung dieses Effektes vorgeschlagenen Möglichkeiten (s. Abschnitt 2.2.2.3) für diesen Zweck geeignet sind.

3.4.1 Material

Für den Sandwich-ELISA und die modifizierte OUCHTERLONY-Technik nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975) wurden die im Abschnitt 3.1.1 aufgeführten Reagenzien und Geräte verwendet. Für die Gewinnung des Kulturüberstandes von *S. aureus* Cowan wurde eine Kühlzentrifuge (Zeta 20, Heraeus Christ) benutzt. Desweiteren wurden eingesetzt:

- hochgereinigtes SPA (Sigma, P 6650)
- unspezifisches Kaninchen- γ -Globulin (Serva, 22540)
- IgG vom Kaninchen (Sigma, I 5006)
- IgG vom Schaf (Sigma, I 5191)
- Pepsin (Sigma, P 7012) zur Spaltung des Anti-SEC₁- γ -Globulins (s. Abschnitt 3.1)

- Borat-Kochsalzpuffer-pH 8,0 folgender Zusammensetzung:

0,13 mol/l NaCl

0,16 mol/l Borsäure (Sigma, B 0252)

0,025 mol/l NaOH

- physiologische Kochsalzlösung

- Sephacryl S-200 superfine (Pharmacia, 17-0871-01)

- 0,1 mol/l Na-Acetatpuffer

- sterile Hirn-Herz-Dextrose-Bouillon (Oxoid, CM 225)

- *S. aureus* Cowan (DSM, 20372)

3.4.2 Reaktion von SPA mit Anti-SEC₁- δ -Globulin im Sandwich-ELISA

3.4.2.1 Methodik

Eine mit Anti-SEC₁- δ -Globulin vom Kaninchen beschichtete Testplatte wurde in Vierfachansätzen je zur Hälfte mit SEC₁- bzw. SPA-Standardlösung (Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 1 μ g bis 50 pg/ml PBS-pH 7,2) beschickt, dann entsprechend Abschnitt 3.3.5 weiterbehandelt und ausgewertet.

3.4.2.2 Ergebnisse

Das eingesetzte handelsübliche SPA zeigte starke Interferenzen im Sandwich-ELISA und führte ab Konzentrationen von ca. 4 ng/ml zu falsch-positiven Ergebnissen (Abb. 8). Dabei entsprach der Substratumsatz z.B. bei 37 ng SPA/ml jenem von 3 ng SEC₁/ml (Tab. 4).

Abb. 8: Reaktion von SEC₁ und SPA im Sandwich-ELISA

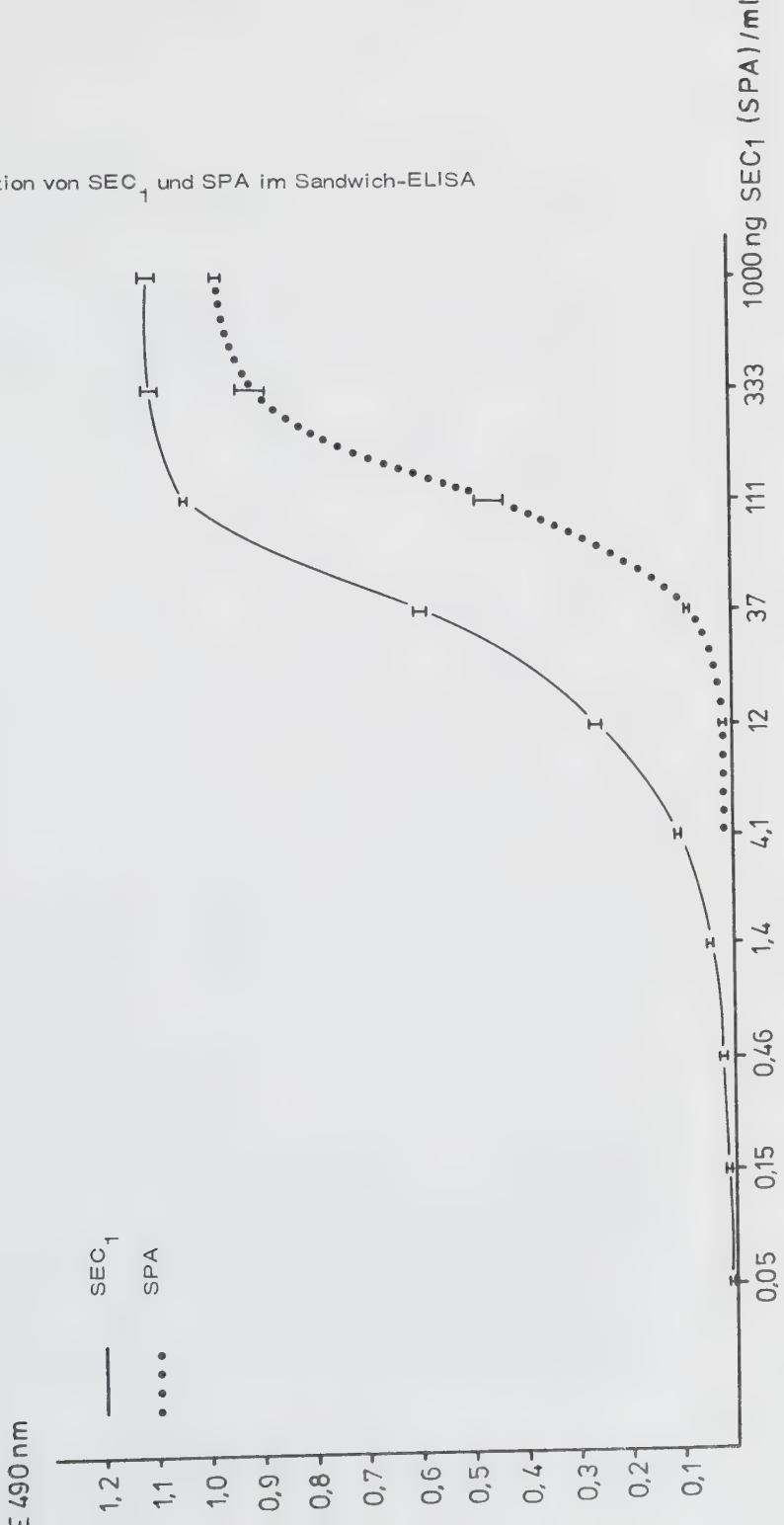


Tabelle 4: SEC₁-Äquivalente zu verschiedenen SPA-Konzentrationen

SPA-Konzentration (ng/ml)	SEC ₁ -Äquivalent (ng/ml)
1000	90
333	77
111	27
37	3
12	0,3

3.4.3 Reaktion von SPA mit Kaninchen-IgG und Schaf-IgG im Sandwich-ELISA

3.4.3.1 Methodik

Im folgenden Versuch wurden verschiedene Kombinationen von handelsüblichem Kaninchen- bzw. Schaf-IgG sowie deren HRPO-Konjugaten auf ihre SPA-Bindungskapazität hin untersucht. Bei den in PBS-pH 7,2 gelösten und zusätzlich auch 1 : 10 bzw. 1 : 20 verdünnten IgG-Präparationen konnte in Vorversuchen mit der modifizierten OUCHTERLONY-Technik (siehe 3.1) die Anwesenheit von AK gegen die Enterotoxine A-E ausgeschlossen werden. Ein Teil des Kaninchen- und des Schaf-IgG wurde nach der unter 3.2 beschriebenen Methode an HRPO gekoppelt, so daß nach Abtrennung des nicht markierten IgG und der freien HRPO vom enzymmarkierten IgG die in Tab. 5 aufgeführten Kombinationsmöglichkeiten von nativem und konjugiertem IgG für die Untersuchungen im Sandwich-ELISA gegeben waren.

Für den Sandwich-ELISA wurden zwei Testplatten je zur Hälfte mit 10 µg/ml unspezifisches Schaf- bzw. Kaninchen-IgG enthaltender PBS (0,1 ml/Ka-

Tabelle 5: Prüfung verschiedener Kombinationen von nativem und enzym-konjugiertem Kaninchen- bzw. Schaf-IgG bezüglich der Bindung von SPA

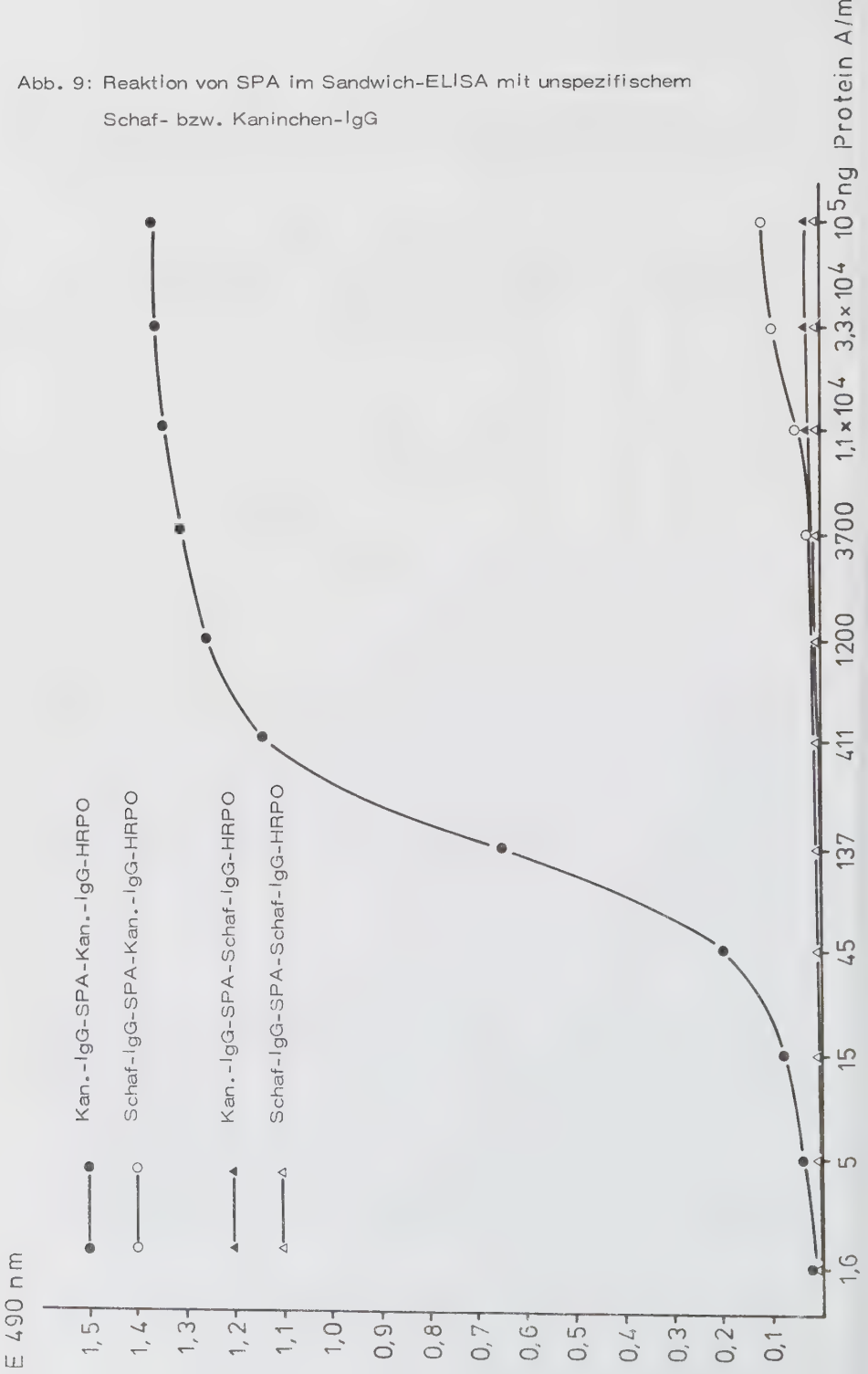
Testplatte	Beschichtung	Konjugat
1	Kaninchen-IgG oder Schaf-IgG	Kaninchen-IgG-HRPO
2	Kaninchen-IgG oder Schaf-IgG	Schaf-IgG-HRPO

vität) beschichtet. Statt SEC₁ wurde SPA in Konzentrationen von 1,6 ng bis 100 µg/ml PBS-pH 7,2 zugegeben und in der in Abschnitt 3.3.5.1 beschriebenen Weise inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit Kaninchen-IgG-HRPO, die andere mit Schaf-IgG-HRPO (Arbeitsverdünnung jeweils 1 : 500) 30 min inkubiert. Die Enzym-Substratreaktion wurde nach 3 min gestoppt. Im übrigen entsprachen die Versuchsbedingungen jenen für den SEC₁-Nachweis (s. Abschnitt 3.3.5.1).

3.4.3.2 Ergebnisse

Abb. 9 zeigt den Einfluß verschiedener Kombinationen von unspezifischem Schaf- bzw. Kaninchen-IgG und deren HRPO-Konjugaten auf die SPA-Bindung im Sandwich-ELISA. Bei einer Beschichtung der Testplatte mit Kaninchen-IgG und Verwendung von Kaninchen-IgG-HRPO führten bereits SPA-Konzentrationen von 5 ng/ml zu deutlich positiven Reaktionen, während bei Schaf-IgG-HRPO entsprechende Resultate erst bei einer Konzentration von

Abb. 9: Reaktion von SPA im Sandwich-ELISA mit unspezifischem Schaf- bzw. Kaninchen-IgG



5 µg SPA/ml beobachtet wurden. Ähnlich - im höheren SPA-Bereich allerdings etwas schlechter - waren die Ergebnisse, wenn zur Beschichtung Schaf-IgG und als Konjugat Kaninchen-IgG-HRPO eingesetzt wurden.

Bei der Kombination von nativem und enzymkonjugiertem Schaf-IgG war selbst bei hohen SPA-Konzentrationen (bis 100 µg/ml) keine Reaktion zu erkennen.

3.4.4 Reaktion von SPA mit dem Untersuchungsmaterial zugesetztem Kaninchen- γ -Globulin

3.4.4.1 Methodik

Da kein Anti-SEC₁-IgG vom Schaf zur Verfügung stand, wurde versucht durch Zusatz von unspezifischem Kaninchen- γ -Globulin zum Untersuchungsmaterial die durch die Bindung von SPA im Sandwich-ELISA hervorgerufenen falsch-positiven Resultate auszuschalten. Das unspezifische Kaninchen- γ -Globulin, bei dem mit der modifizierten OUCHTERLONY-Technik (s. Abschnitt 3.1) keine AK gegen SE nachgewiesen werden konnten, wurde im ersten Versuchsabschnitt in PBS-pH 7,2 gelöstem SPA (Konzentrationen: 14 ng bis 10 µg/ml) in Mengen von 10, 50, 100 bzw. 200 µg pro ml zugesetzt (jeweils Dreifachansätze) und 30 min bei Raumtemperatur auf einem Taumler inkubiert. Im zweiten Versuchsabschnitt wurden die erwähnten Mengen unspezifisches Kaninchen- γ -Globulin zu unverdünntem SPA-haltigen Kulturüberstand gegeben, der durch 24 stündige Inkubation (37 °C) von mit *S. aureus* Cowan (DSM, 20372) beimpfter Hirn-Herz-Dextrose-Bouillon (BHI) und anschließender Zentrifugation (10.000 U/min; 20 min) gewonnen worden war.

Als Kontrollen wurden gewählt: in PBS-pH 7,2 gelöstes SPA in o.a. Konzentrationen, in PBS-pH 7,2 gelöstes und verdünntes SEC₁ (Konzentration 50 pg bis 1 µg), dem pro ml jeweils 200 µg Kaninchen- γ -Globulin zugesetzt worden war, sowie PBS und 24 h inkubierte unbeimpfte BHI.

Die mit Anti-SEC₁- γ -Globulin vom Kaninchen beschichteten Testplatten

wurden mit den erwähnten Proben beschickt und entsprechend Abschnitt 3.3.5.1 weiterbehandelt sowie ausgewertet.

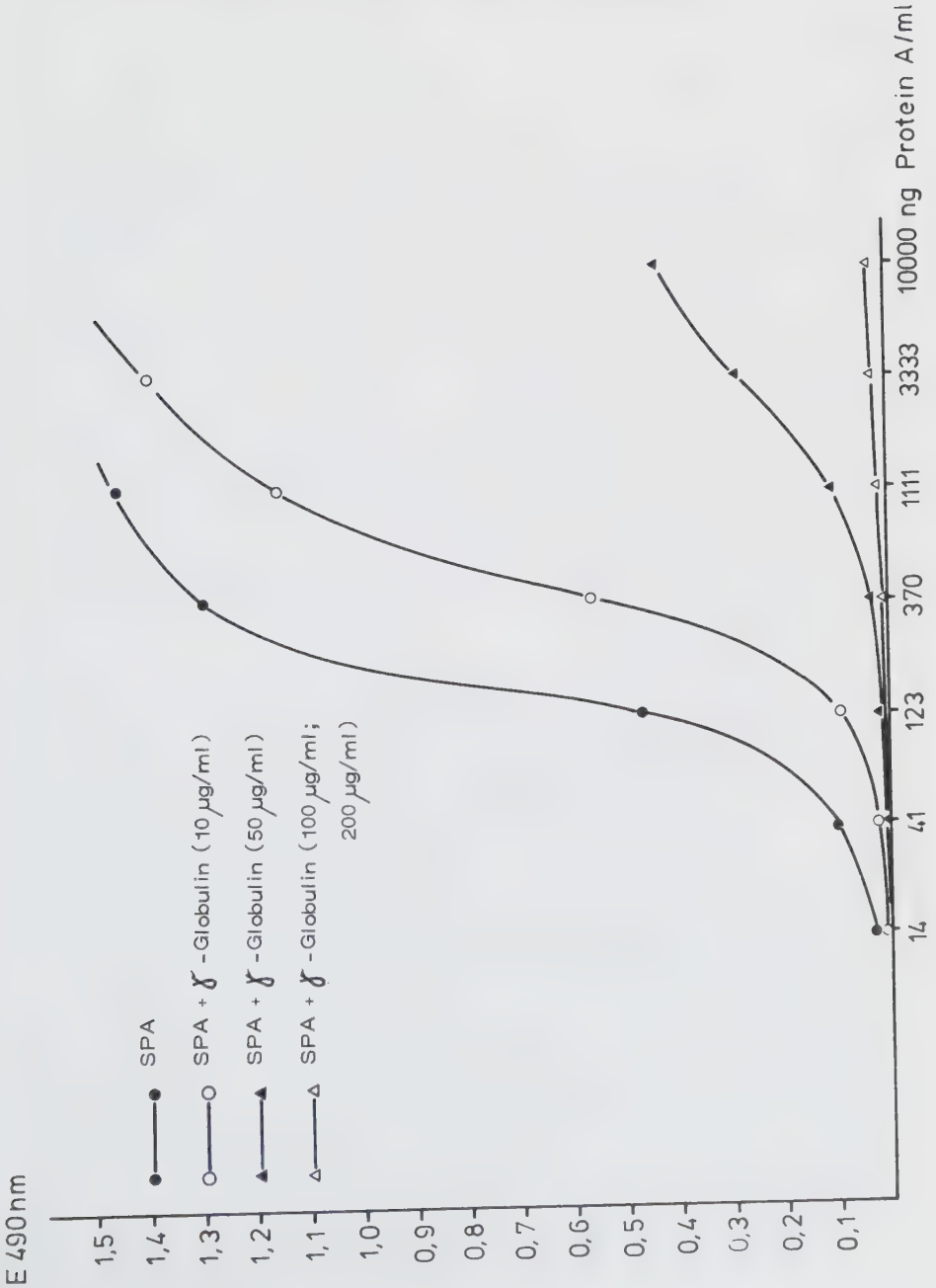
3.4.4.2 Ergebnisse

Durch Zusatz von unspezifischem Kaninchen- γ -Globulin zu standardisierten SPA-Lösungen oder Kulturüberständen von *S. aureus* Cowan konnten die SPA-Interferenzen reduziert werden, wobei der Grad der Reaktion von SPA mit Anti-SEC₁- γ -Globulin von der Menge des dem Untersuchungsmaterial zugesetzten unspezifischen Kaninchen- γ -Globulin abhängig war (Abb. 10; Tab. 6). Die spezifische Reaktion von SEC₁ mit dem Coating-AK wurde durch das unspezifische γ -Globulin nicht behindert.

Tabelle 6: SPA-Interferenzen im Sandwich-ELISA nach Zusatz von unspezifischem Kaninchen- γ -Globulin zu in PBS gelöstem SPA

γ -Globulinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$)	SPA-Interferenzen ab (ng/ml)
10	40
50	370
100	1100
200	1100

Abb. 10: Reaktion von SPA im Sandwich-ELISA nach Zusatz von
 unspezifischem Kaninchen- γ -Globulin zur Testlösung



3.4.5 Reaktion von SPA mit Anti-SEC₁-F(ab')₂-Fragmenten im Sandwich-ELISA

3.4.5.1 Methodik

Da auch durch die enzymatische Abspaltung des Fc-Teils vom spezifischen AK die durch SPA bedingten falsch-positiven Ergebnisse im Sandwich-ELISA vermeidbar sein sollen (s. Abschnitt 2.2.2.3), wurde das zur Verfügung stehende Anti-SEC₁- γ -Globulin vom Kaninchen (s. Abschnitt 3.1.2) zur Gewinnung von F(ab')₂-Fragmenten mit Pepsin behandelt.

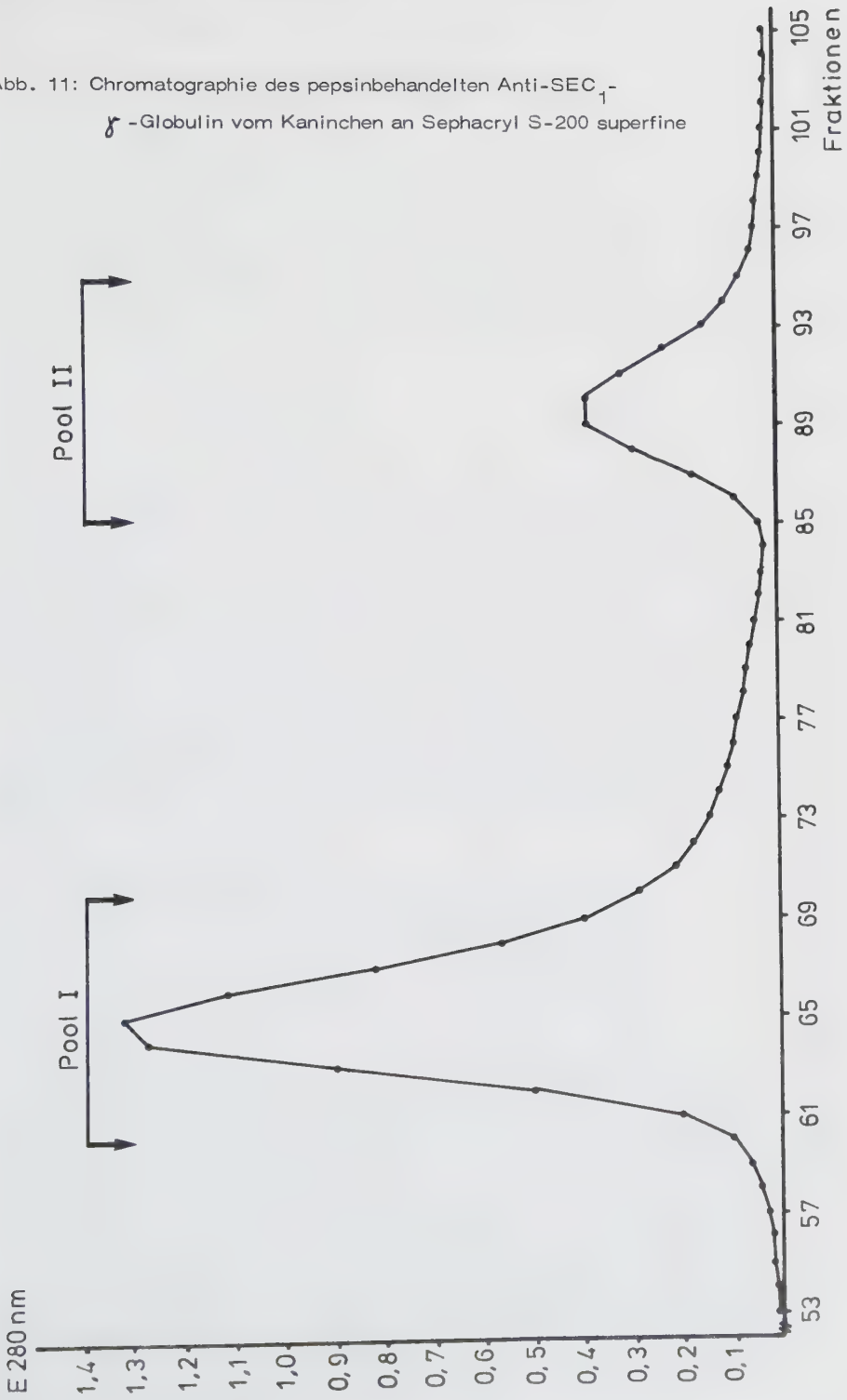
Die Spaltung wurde in Anlehnung an die Methode von MADSEN und RODKEY (1976) folgendermaßen durchgeführt:

- Dialyse von 50 mg Anti-SEC₁- γ -Globulin (gelöst in 5 ml PBS-pH 7,2) über Nacht bei 4 °C gegen 0,1 mol/l Na-Acetatpuffer-pH 7,0;
- Lösung von Pepsin in auf pH 4,3 eingestelltem 0,1 mol/l Na-Acetatpuffer in einer Konzentration von 4 mg/ml,
- Einstellung des pH der γ -Globulinlösung auf 4,3 und Zugabe von 0,3 ml der Pepsinlösung,
- 8-stündige Digestion bei 37 °C im Brutschrank,
- Dialyse des Reaktionsgemisches über Nacht gegen 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Borat-Kochsalzpuffer-pH 8,0,
- Auftrennung des Reaktionsgemisches durch Gelchromatographie an Sephacryl S-200 superfine; Äquilibration des Gels und Elution der Spaltprodukte mit 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntem Borat-Kochsalzpuffer.

In Abb. 11 ist die Auftrennung des Reaktionsgemisches (Fraktionen á 2,75 ml) auszugsweise dargestellt. Die Fraktionen 60-70 bzw. 85-95 wurden gepoolt und die Proteinkonzentration nach LOWRY et al. (1951) bestimmt.

Anschließend wurden zwei Testplatten mit Material aus einem der beiden Pools bzw. als Referenz mit Anti-SEC₁- γ -Globulin beschichtet (Proteinkonzentration jeweils 10 µg/ml) und dann je 30 min mit SPA- und SEC₁-Standardlösung (Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 1 µg bis 50 pg/ml PBS-pH 7,2)

Abb. 11: Chromatographie des pepsinbehandelten Anti-SEC₁-
γ-Globulin vom Kaninchen an Sephacryl S-200 superfine



sowie Anti-SEC₁-HRPO als Konjugat inkubiert. Die Enzym-Substratreaktion wurde analog der optimierten Methode (s. Abschnitt 3.3.5) nach 4 min gestoppt. Eine weitere Testplatte wurde nur mit Material aus Pool 1 beschichtet (s.o.), mit SPA- bzw. SEC₁-Standardlösung (Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 1 µg bis 50 pg/ml PBS-pH 7,2) beschickt und wie oben weiterbehandelt.

3.4.5.2 Ergebnisse

Das aus Pool 1 stammende Material (F(ab')₂-Fragmente) reagierte stark mit dem homologen Antigen - SEC₁ -, nicht aber mit SPA, während das Material aus Pool 2 (wahrscheinlich pFc'-Fragmente) weder mit SEC₁ noch SPA reagierte. Ein Vergleich mit dem bei der Beschichtung der Testplatte in gleicher Konzentration mitgeführten Anti-SEC₁-γ-Globulin zeigte, daß F(ab')₂-Fragmente in annähernd demselben Maß adsorptiv gebunden wurden wie das ungespaltene Anti-SEC₁-γ-Globulin. Die Reaktion von spezifisch gegen SEC₁ gerichteten F(ab')₂-Fragmenten mit verschiedenen SEC₁-Konzentrationen ist in Abb. 12 dargestellt; bei SPA waren wiederum keine positiven Resultate zu beobachten.

3.5 Nachweis von SEC₁ mittels Sandwich-ELISA in Kulturüberständen und Lebensmitteln

3.5.1 Material

Die für die Durchführung des Sandwich-ELISA verwendeten Reagenzien und Geräte sind im Abschnitt 3.3.1 aufgeführt; abweichend davon wurden die Testplatten jedoch mit Anti-SEC₁-F(ab')₂-Fragmenten (siehe 3.4.5) beschichtet.

Für die Untersuchung von Kulturüberständen wurde von der institutseigenen Sammlung eine Auswahl von 14 enterotoxinogenen und nicht-enterotoxinogenen *S. aureus*-Stämmen zur Verfügung gestellt. Diese Stämme waren mit

Abb. 12: Reaktion spezifischer $F(ab')_2$ -Fragmente mit SEC_1 und Protein A



den Zahlen 1 bis 14 codiert, so daß bei der Untersuchung nichts über ein eventuelles Enterotoxinbildungsvermögen bekannt war. Als Medium fand BHI (Oxoid, CM 225) Verwendung, für die Herstellung der Kulturüberstände wurde eine Kühlzentrifuge (Zeta 20, Heraeus Christ) benutzt.

Für die Kontamination von Lebensmitteln mit SEC₁-bildenden Staphylokokken diente *S. aureus* FRI 137, als Kontrolle lief der nicht-enterotoxinogene *S. aureus* FRI 184 mit.

Bei den für die Versuche eingesetzten Lebensmitteln handelte es sich um folgende im Einzelhandel erworbene Produkte:

- a) Eier-Teigwaren
- b) Langkorn-Kochbeutelreis
- c) Kartoffelsalat mit Mayonnaise
- d) Schweinehackfleisch
- e) Rohwurst (Salami)
- f) Ultrahocherhitzte Milch mit 1,5 bzw. 3,5 % Fett

Die Zerkleinerung der Lebensmittel in PBS-pH 7,2 erfolgte in einem Labor-mixer (Waring-Blendor), zur Entfernung von Fett wurde äthanolstabilisiertes Chloroform (Merck, 2445) im Verhältnis 1 : 1 zugesetzt. Zur Trennung der Phasen diente ein Scheidetrichter. Die Überstände wurden in einer hoch-tourigen Kühlzentrifuge (Cryofuge 20-3, Heraeus Christ) gewonnen, der pH-Wert mit 3 mol/l HCl bzw. 5 mol/l NaOH eingestellt.

Der Thermonuklease-Test bei Milch wurde in Anlehnung an ZAADHOF (1978a), jener bei Teigwaren unter Zusatz von Pepton (Merck, 7214) in der von BECKER (1984) beschriebenen Weise mit den jeweils angegebenen Reagenzien durchgeführt.

3.5.2 Untersuchung von *S. aureus*-Kulturüberständen

3.5.2.1 Methodik

Insgesamt 14 für die Untersuchung auf Schrägagar überlassene, fortlaufend nummerierte enterotoxinogene und nicht-enterotoxinogene *S. aureus*-Stämme wurden in BHI überimpft und 24 Std bei 37 °C inkubiert (Standkultur). Anschließend wurden durch Zentrifugieren bei 10.000 U/min für 20 min Kulturüberstände gewonnen. Als Negativ-Kontrolle diente der Überstand des nicht-enterotoxinogenen *S. aureus* FRI 184. Der Sandwich-ELISA wurde mit den Kulturüberständen in der in Abschnitt 3.3.5 beschriebenen standardisierten Form durchgeführt, allerdings mit Anti-SEC₁-F(ab')₂-Fragmenten an Stelle von Anti-SEC₁- γ -Globulin vom Kaninchen.

3.5.2.2 Ergebnisse

Bei insgesamt sechs Stämmen (Nr. 4-9) wurden eindeutig positive Ergebnisse registriert (Abb. 13); bei einem weiteren Stamm (Nr. 1) lag der Substratumsatz zwar geringfügig über dem Niveau der Negativ-Kontrolle (*S. aureus* FRI 184), doch war dieser Unterschied statistisch nicht abzusichern und die Probe somit als negativ zu beurteilen. Die Aufschlüsselung der Kodierung ergab, daß es sich bei den als positiv erkannten Stämmen tatsächlich um Bildner von SEC₁ bzw. SEC₂ gehandelt hatte (Tab. 7). Kreuzreaktionen mit Kulturüberständen anderer SE-Bildner bzw. nicht-enterotoxinogener Stämme traten nicht auf. Der erwähnte geringfügige aber nicht als positiv zu beurteilende Substratumsatz wurde von einem SEE-Bildner (FRI 326) ausgelöst. Die Nachweisgrenze lag bei 50 pg SEC₁/ml BHI.

Abb. 13: Nachweis von SEC in *S. aureus*-Kulturüberständen mittels Sandwich-ELISA

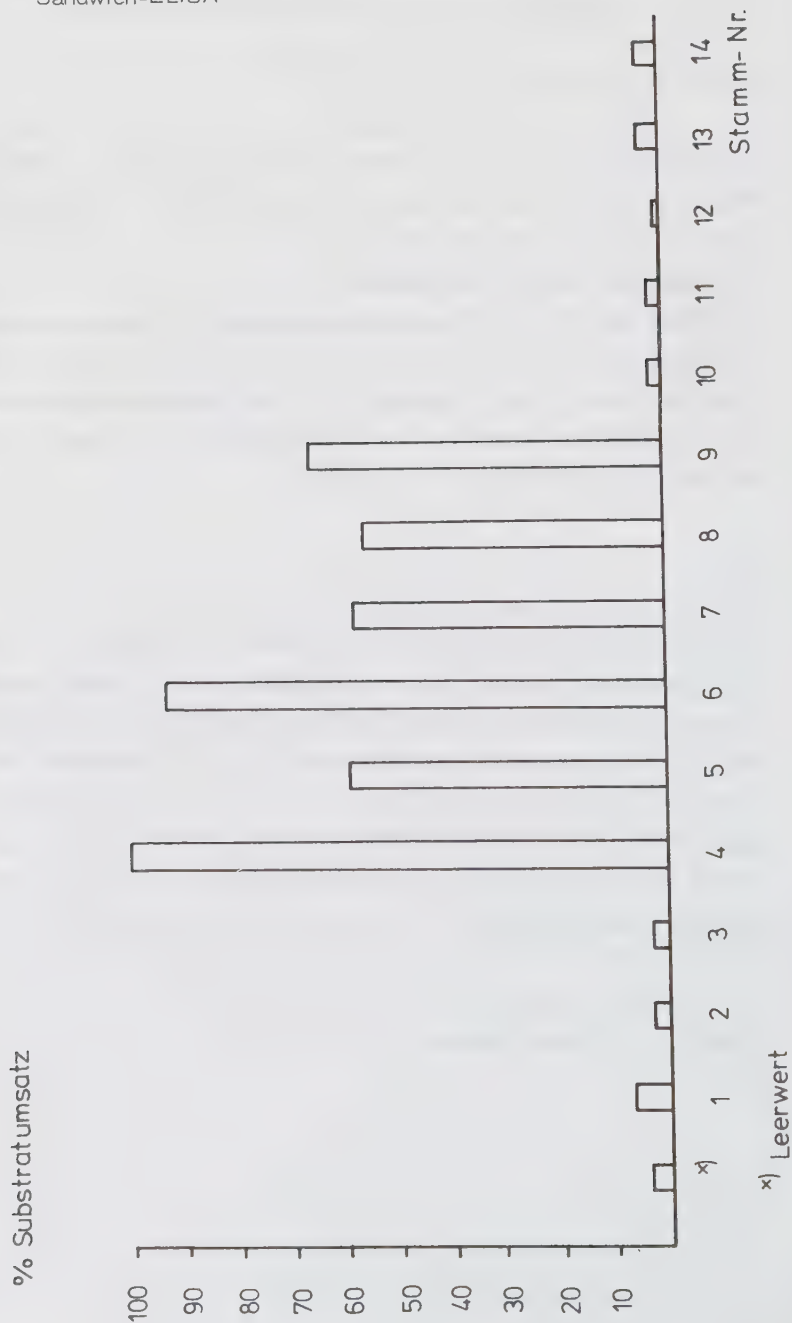


Tabelle 7: Im Sandwich-ELISA untersuchte *S. aureus*-Stämme

Code-Nr.	Enterotoxinbildungsvermögen (SE-Typ)
1	+ (E)
2	+ (D)
3	+ (B)
4	+ (C ₁)
5	+ (C ₂)
6	+ (C ₁)
7	+ (C ₁)
8	+ (C ₂)
9	+ (C ₂)
10	-
11	-
12	-
13	+ (A)
14	-

3.5.3 Untersuchung von mit SEC₁ künstlich kontaminierten Lebensmitteln

3.5.3.1 Methodik

Für die Gewinnung von Homogenisaten wurden die festen Lebensmittel (Hackfleisch, Kartoffelsalat mit Mayonnaise, Eier-Teigwaren, Reis, Salami) mit PBS-pH 7,2 (150 ml/100 g Probe bzw. bei Nudeln 200 ml/100 g) versetzt und solange im Waring-Blendor zerkleinert, bis ein homogener Lebensmittelbrei vorlag. Der Reis wurde zuvor angekocht, die Eier-Teigwaren wurden vorher ca. 30 min in der PBS eingeweicht.

Zu den derartig hergestellten Homogenisaten bzw. zur wärmebehandelten Milch (300 ml) wurden 0,1 µg, 1 µg bzw. 10 µg gereinigtes SEC₁ (s. Abschnitt 3.1.1) zugesetzt. Anschließend wurden die Proben nach dem in Abb. 14 wiedergegebenen Schema weiterbehandelt, bei der Milch war - wie in Vorversuchen festgestellt wurde - keine Extraktion erforderlich. In gleicher Weise extrahierte toxfreie Lebensmittel bzw. Milch dienten als Negativkontrollen bzw. zur Erstellung einer Standardkurve unter Verwendung von gereinigtem SEC₁.

Der Sandwich-ELISA wurde unter Verwendung von mit Anti-SEC₁-F(ab')₂-Fragmenten beschichteten Mikrotiterplatten in der in Abschnitt 3.3.5 beschriebenen Art mit den Extrakten der Stufen I und II bzw. III (nur Hackfleisch und Kartoffelsalat mit Mayonnaise) sowie Milch durchgeführt.

Der SEC₁-Gehalt der als Homogenisate kontaminierten Extrakte bzw. Milch wurde durch Interpolation der SEC₁-Standardkonzentrationen mit einer natürlichen, kubischen Splinefunktion errechnet. Dabei wurden nur Probenextinktionen berücksichtigt, die mit einer statistischen Sicherheit von > 99 % von der Negativkontrolle abwichen. Aus den erhaltenen Werten wurden abschließend die Recovery-Raten berechnet.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Homogenisate bzw. die Milch mit 0,01 µg SEC₁ kontaminiert. Im Rahmen dieser Experimente bestand die Extraktion nur aus der Zentrifugation des Homogenisates; es wurde somit nur Material der Extraktionsstufe I (s. Abb. 14) bzw. Milch direkt auf die Anwesenheit von SEC₁ geprüft. Unter Berücksichtigung der geringen zugesetzten SEC₁-Konzentrationen erfolgte der Nachweis nur qualitativ.

3.5.3.2 Ergebnisse

SEC₁ konnte in allen Lebensmitteln unabhängig von der zugesetzten Menge (0,1, 1 bzw. 10 µg pro 100 g oder 300 ml) nachgewiesen werden. Die bei den verschiedenen Lebensmitteln mit Hilfe eines Rechners bestimmten durchschnittlichen Wiederfindungsraten sind in Tab. 8 zusammenfassend

Abb. 14: Herstellung von Lebensmittelextrakten für den Nachweis von SEC
im Sandwich-ELISA

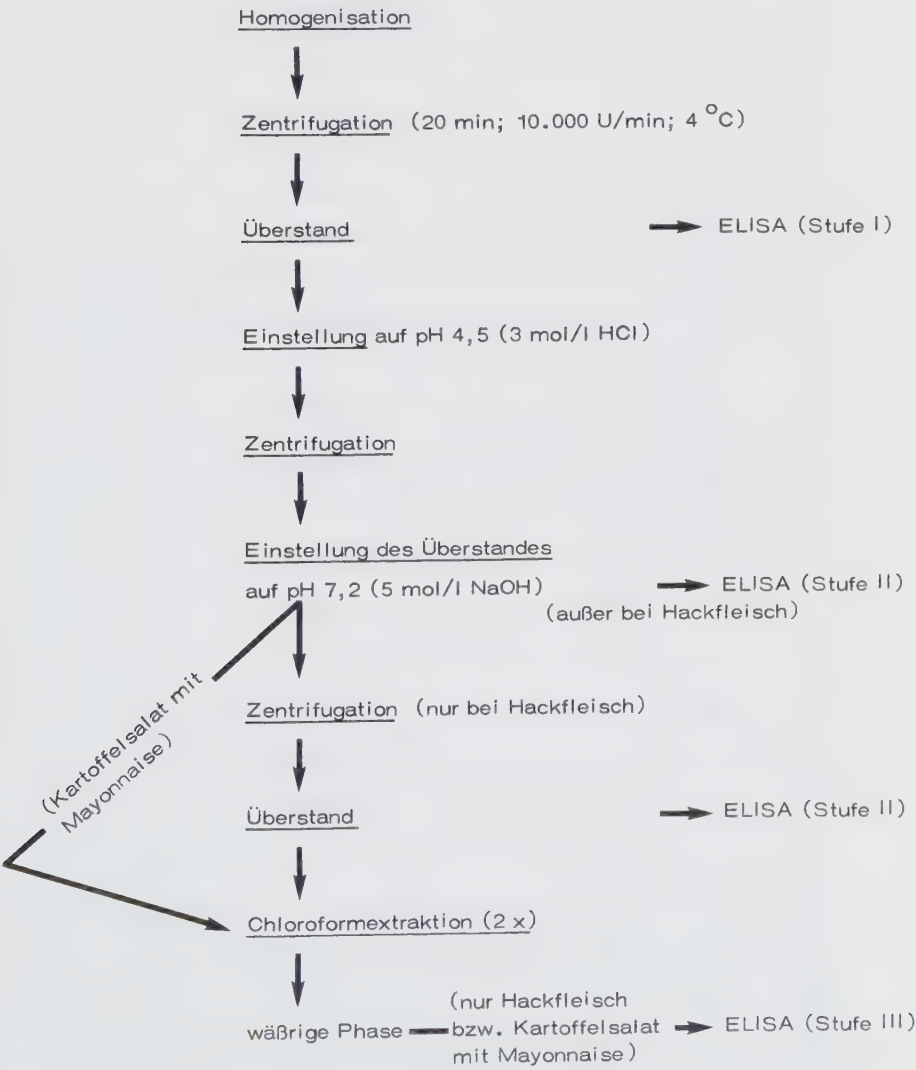


Tabelle 8: Durchschnittliche Wiederfindungsraten in verschiedenen mit SEC₁ kontaminierten Lebensmitteln

Extraktionsstufe	durchschnittliche SEC ₁ -Recovery (%)					
	Hackfleisch	Kartoffelsalat	Teigwaren	Reis	Salami	Milch
0	n.d. ^{x)}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	91
I	90	74	62	88	66	n.d.
II	87	78	78	32	62	n.d.
III	83	81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

x) n.d. = nicht durchgeführt

dargestellt. Diesen Daten ist zu entnehmen, daß bei Hackfleisch, Kartoffelsalat sowie Salami nach Abzentrifugieren der festen Lebensmittelbestandteile (Extraktionsstufe I) und Säurefällung (Extraktionsstufe II) keine Unterschiede in den Recovery-Raten bestanden und sich bei den beiden erstgenannten Produkten auch nach Chloroformextraktion (Stufe III) vergleichbare Werte ergaben. Im Gegensatz dazu war die SEC_1 -Wiederfindungs-Rate bei Teigwaren in Stufe II deutlich höher als in Stufe I, während bei Reis umgekehrte Verhältnisse gegeben waren. Ein Einfluß der SEC_1 -Konzentration im Lebensmittel auf die Recovery ließ sich bei Salami und insbesondere Reis insofern erkennen, als bei Zusatz von $0,1 \mu g SEC_1$ um etwa 20 % niedrigere Wiederfindungsraten als bei den beiden anderen Konzentrationen registriert wurden. Die Substratumsätze der SE-freien Lebensmittelextrakte und PBS lagen auf gleichem Niveau, so daß unspezifische Reaktionen durch Lebensmittelinhaltsstoffe ausgeschlossen werden konnten.

Bei Zusatz von nur $0,01 \mu g SEC_1$ und Untersuchung von Material der Extraktionsstufe I konnte bei Hackfleisch, Kartoffelsalat, Teigwaren sowie Salami ein positives Resultat registriert werden. Bei Milch, bei der diese SEC_1 -Menge entsprechend den Anforderungen von BERGDOLL (1979) zu 300 ml gegeben worden war, verlief der Nachweis ebenso wie beim Reis negativ.

3.5.4 Untersuchung von mit SEC_1 -bildenden Staphylokokken beimpften Lebensmitteln

3.5.4.1 Methodik

Die Untersuchungen wurden an Eier-Teigwaren und ultrahocherhitzter Milch (1,5 bzw. 3,5 % Fett) durchgeführt. Zur Kontamination der Nudeln wurden zuerst 5 ml BHI mit dem SEC_1 -bildenden *S. aureus* FRI 137 bzw. - als Kontrolle - mit dem nicht-enterotoxinogenen *S. aureus* FRI 184 beimpft und danach 24 h bei $37^\circ C$ bebrütet (Standkultur); anschließend wurde diese

Vorkultur in 95 ml BHI überführt, Nudeln (100 g) zugegeben und wie oben inkubiert. Parallel dazu wurden 95 ml Milch (1,5 bzw. 3,5 % Fett) mit 5 ml einer mit o.a. Stämmen beimpften und 24 h bei 37 °C inkubierten Milch versetzt und wiederum bebrütet. Mit den inkubierten Lebensmittelproben - bei den Teigwaren nach Zusatz von 100 ml PBS-pH 7,2 und Homogenisation - wurde dann der Thernonuklease-Test (ZAADHOF, 1978a) durchgeführt, bei den Nudeln unter Zusatz von Pepton (BECKER, 1984). Aufgrund der positiven Resultate bei allen untersuchten Proben konnte davon ausgegangen werden, daß die für eine Bildung von SEC₁ in krankmachenden Dosen erforderliche Vermehrung der Staphylokokken stattgefunden hatte. Die Eier-Teigwaren wurden daher nach Durchführung der Säurefällung (s. Abschnitt 3.5.3), die Milch ohne jegliche Vorbehandlung im Sandwich-ELISA unter Verwendung von mit Anti-SEC₁-F(ab')₂-Fragmenten beschichteten Mikrotiterplatten untersucht. (s. Abschnitt 3.3.5). Zusätzlich zum qualitativen Nachweis wurde auch eine quantitative Auswertung vorgenommen. Als Negativkontrolle und zur Verdünnung des SEC₁-Standards diente der Extrakt der mit *S. aureus* FRI 184 beimpften Lebensmittelproben.

3.5.4.2 Ergebnisse

Die Untersuchung der mit *S. aureus* FRI 137 beimpften Lebensmittel ergab sowohl bei den Eier-Teigwaren als auch den ultrahocherhitzten Milchproben mit 3,5 % bzw. 1,5 % Fett positive Resultate. Die nachgewiesenen SEC₁-Mengen pro 100 g bzw. ml beliefen sich auf 27 µg (teilentrahmte Milch), 19 µg (Vollmilch) bzw. 2 µg (Teigwaren).

3.6 Untersuchungen zur Stabilität von Immunosorbens und Konjugat

Für die Untersuchungen - auch von Lebensmitteln - muß Konjugat bereitstehen. Der erforderliche Zeitaufwand läßt sich erheblich abkürzen, wenn auch das Immunosorbens vorrätig ist. Es sollte daher die Stabilität von Immunosorbens und Konjugat unter verschiedenen Bedingungen geprüft werden.

3.6.1 Material

Alle für den Sandwich-ELISA erforderlichen Reagenzien und Geräte sind unter 3.3.1 aufgeführt. Für den ersten Versuchsabschnitt (Immunosorbens) wurden die Testplatten in PVC-Beutel eingeschweißt, wobei den trockengelagerten Chargen Silicagel (Sigma, S 7500) zugegeben wurde. Konjugat in Arbeitsverdünnung (1 : 400) wurde in die für den einzelnen Test erforderlichen Portionen (11 ml) aufgeteilt und tiefgefroren.

Für den zweiten Versuchsabschnitt (Konjugat) wurde unverdünntes, frisch hergestelltes Konjugat verwendet.

3.6.2 Lagerungsfähigkeit des Immunosorbens

3.6.2.1 Methodik

Durch eine Lagerung von Testplatten über einen Zeitraum von zwei Jahren sollte zunächst festgestellt werden, ob der zur AK-Bindung verwendete Puffer die Lagerungsfähigkeit des Immunosorbens beeinflußt.

Dazu wurde Anti-SEC₁- γ -Globulin zum einen in PBS-pH 7,2, zum anderen in Natriumcarbonat-Bicarbonatpuffer-pH 9,6 gelöst und auf eine Proteinkonzentration von 10 μ g/ml eingestellt (s.a. Abschnitt 3.3.2). 13 Testplatten wurden je zur Hälfte mit einer dieser Lösungen beschichtet (0,1 ml/Kavität) 3 h bei 37 °C inkubiert und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Eine Platte (Referenz) wurde nach Absaugen der AK-Pufferlösung und Absättigung der

freien Bindungsstellen mit in PBS-pH 7,2 gelöstem SEC₁ (Konzentrationen: 50 pg/ml bis 1 µg/ml) beschickt und entsprechend Abschnitt 3.3.5 weiterbehandelt und ausgewertet; 12 Platten wurden zusammen mit der AK-Pufferlösung tiefgefroren (- 20 °C) und einzeln in PVC-Folien eingeschweißt. Die AG-Bindungskapazität der gelagerten Platten wurde in zweimonatigem Abstand im ELISA ermittelt und mit der Referenzplatte verglichen. Vor dem Test wurden die gelagerten Platten 15 min bei 37 °C im Brutschrank aufgetaut.

Außerdem sollte in einem über den gleichen Zeitraum sich erstreckenden Versuch ermittelt werden, ob durch eine Bindung von AK an vorbehandelte Polystyroloberflächen eine gegenüber der einfachen adsorptiven Bindung verbesserte Lagerfähigkeit erreicht werden kann.

Dazu wurden 25 Testplatten - je zur Hälfte unbehandelt bzw. nach der unter 3.3.2.1 aufgeführten Methode von HOWELL et al. (1981) mit Glutaraldehyd vorbehandelt - mit Anti-SEC₁-γ-Globulin beschichtet, 3 h bei 37 °C inkubiert und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Eine Platte (Referenz) wurde sofort (s.o.) im ELISA ausgewertet, die übrigen folgendermaßen gelagert: 12 Platten (Charge I) wurden zusammen mit der AK-Pufferlösung tiefgefroren und einzeln in PVC-Folie eingeschweißt; 12 Platten (Charge II) wurden mit der AK-Pufferlösung bei 37 °C im Brutschrank luftgetrocknet und zusammen mit 15 g Silicagel einzeln in PVC-Folien eingeschweißt. Beide Chargen wurden bei - 20 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Die AG-Bindungskapazität der Platten wurde wie oben ermittelt (2 monatiger Abstand).

In einem für einen Zeitraum von sechs Monaten angelegten Versuch sollte schließlich festgestellt werden, wie lange das Immunosorbens unter ungünstigen Lagerungsbedingungen vorrätig gehalten werden kann.

Dazu wurden 37 Testplatten mit Anti-SEC₁-γ-Globulin in der oben erwähnten Weise beschichtet. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C im Brutschrank luftgetrocknet. Eine Platte (Referenz) wurde danach entsprechend 3.3.5 beschickt und im ELISA ausgewertet, die übrigen zusammen mit 15 g Silicagel

einzelnen in PVC-Folien eingeschweißt und folgendermaßen gelagert:

- a) Charge I (12 Platten): Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank
- b) Charge II (12 Platten): Lagerung bei Raumtemperatur im Dunkeln
- c) Charge III (12 Platten): Lagerung bei Raumtemperatur und Tageslicht.

Die AG-Bindungskapazität der gelagerten Platten wurden in 14-tägigen Abständen ermittelt.

3.6.2.2 Ergebnisse

Die AG-Bindungskapazität nahm bei Lagerung der AK-beschichteten Testplatten unterschiedlich schnell ab. Dabei zeigten sich Einflüsse seitens der Art der zur Beschichtung und Lagerung eingesetzten AK-Pufferlösung, der Art der Lagerung (feucht bzw. trocken) sowie der Lagerungstemperatur, während die Vorbehandlung der Polystyroloberflächen mit Glutaraldehyd nur bei trockengelagerten Platten von Bedeutung war (Tab. 9). Ein Vergleich der Platten, die bei neutralem (PBS-pH 7,2) bzw. alkalischem pH (Natriumcarbonat-Bicarbonatpuffer-pH 9,6) mit AK beschichtet wurden, zeigt, daß bei ersteren die AG-Bindungskapazität langsamer abnahm (Abb. 15). Die Vorbehandlung der Polystyroloberfläche mit Glutaraldehyd brachte nur bei trockengelagerten Platten eine deutlich bessere Lagerfähigkeit (Abb. 16). Die trockengelagerten Platten verloren im übrigen unabhängig davon, ob sie vorbehandelt waren oder nicht, ihre AG-Bindungskapazität deutlich schneller als die mit AK-Pufferlösung tiefgefrorenen Platten. Testplatten, die bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank aufbewahrt wurden, hatten schon nach zwei Wochen 50 % ihrer AG-Bindungskapazität verloren (Abb. 17), unabhängig davon, ob sie lichtgeschützt aufbewahrt wurden oder nicht.

Tabelle 9: Verlust der Antigenbindungskapazität antikörperbeschichteter Testplatten in Abhängigkeit von Art und Dauer der Lagerung

Versuch	Art der Lagerung	Lagerungstemperatur	Verlust von 50 % der AG-Bindungskapazität nach (d)
I	mit AK-Pufferlösung (PBS-pH 7,2)	- 20 °C	ca. 225
	mit AK-Pufferlösung (Natriumcarbonat-Bicarbonat-pH 9,6)	- 20 °C	ca. 140
	mit AK-Pufferlösung	- 20 °C	ca. 225
	mit AK-Pufferlösung, Platte vorbehandelt	- 20 °C	ca. 230
II	Trockenlagerung	- 20 °C	ca. 85
	Trockenlagerung, Platte vorbehandelt	- 20 °C	ca. 125
III	Trockenlagerung (dunkel)	4 °C	ca. 15
	Trockenlagerung (dunkel)	RT x)	14
	Trockenlagerung (hell)	RT	14

x) Raumtemperatur

Abb. 15: Einfluß des Beschichtungspuffers auf die Lagerfähigkeit
des Immunosorbens bei - 20 °C

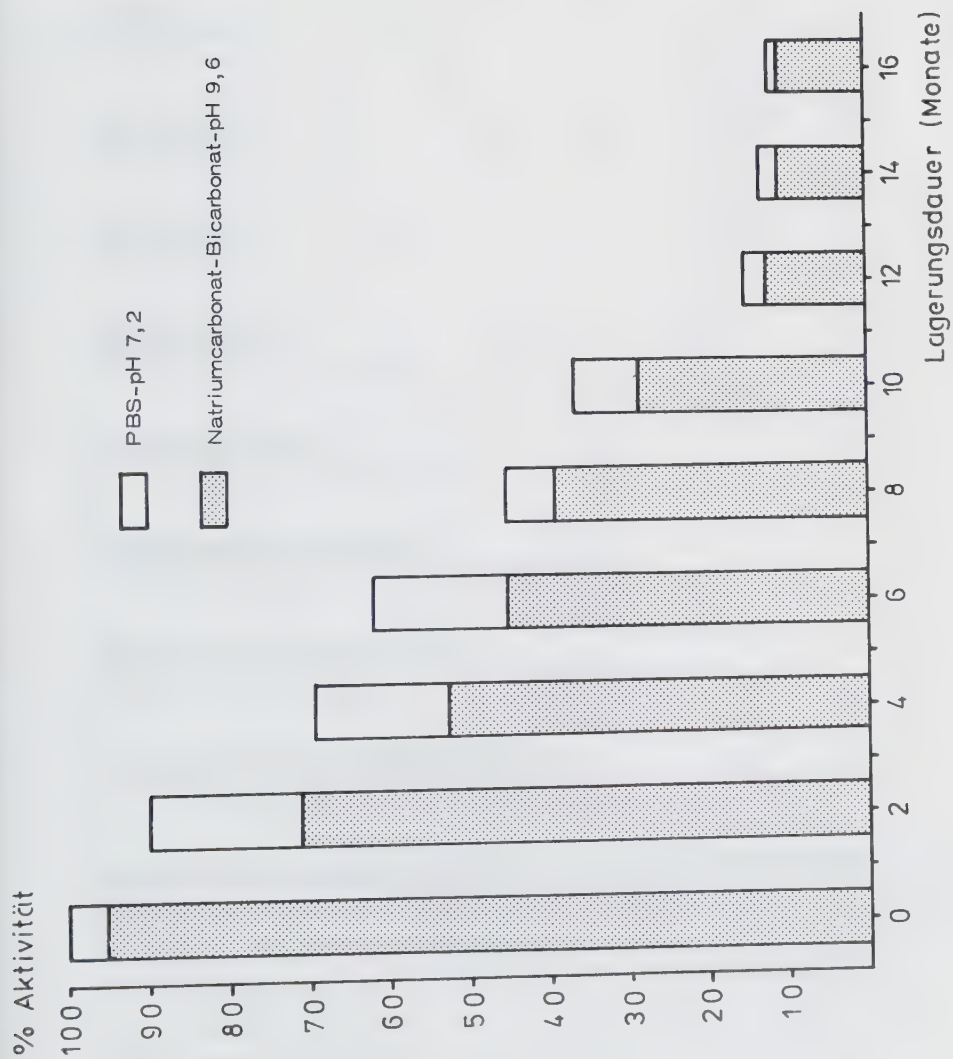


Abb. 16: Einfluß der Glutaraldehydvorbehandlung auf die Lagerfähigkeit des Immunosorbens bei - 20 °C

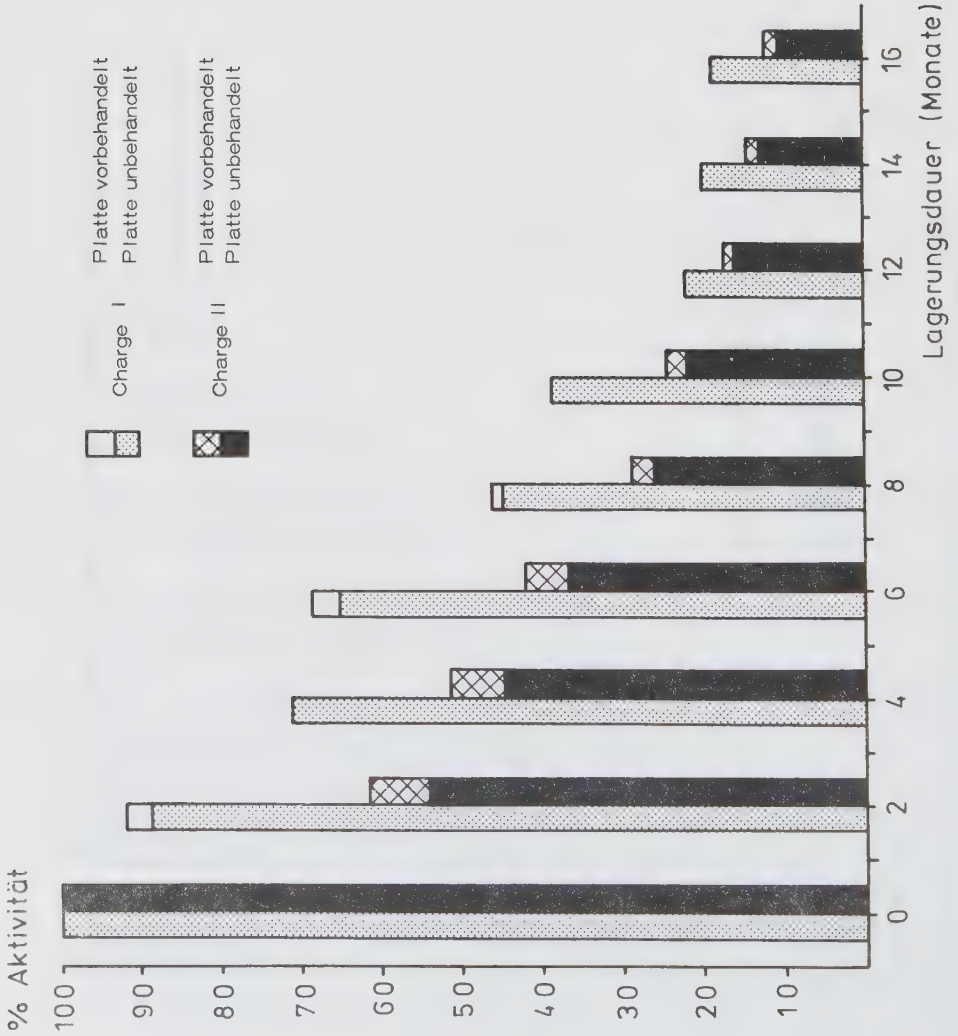
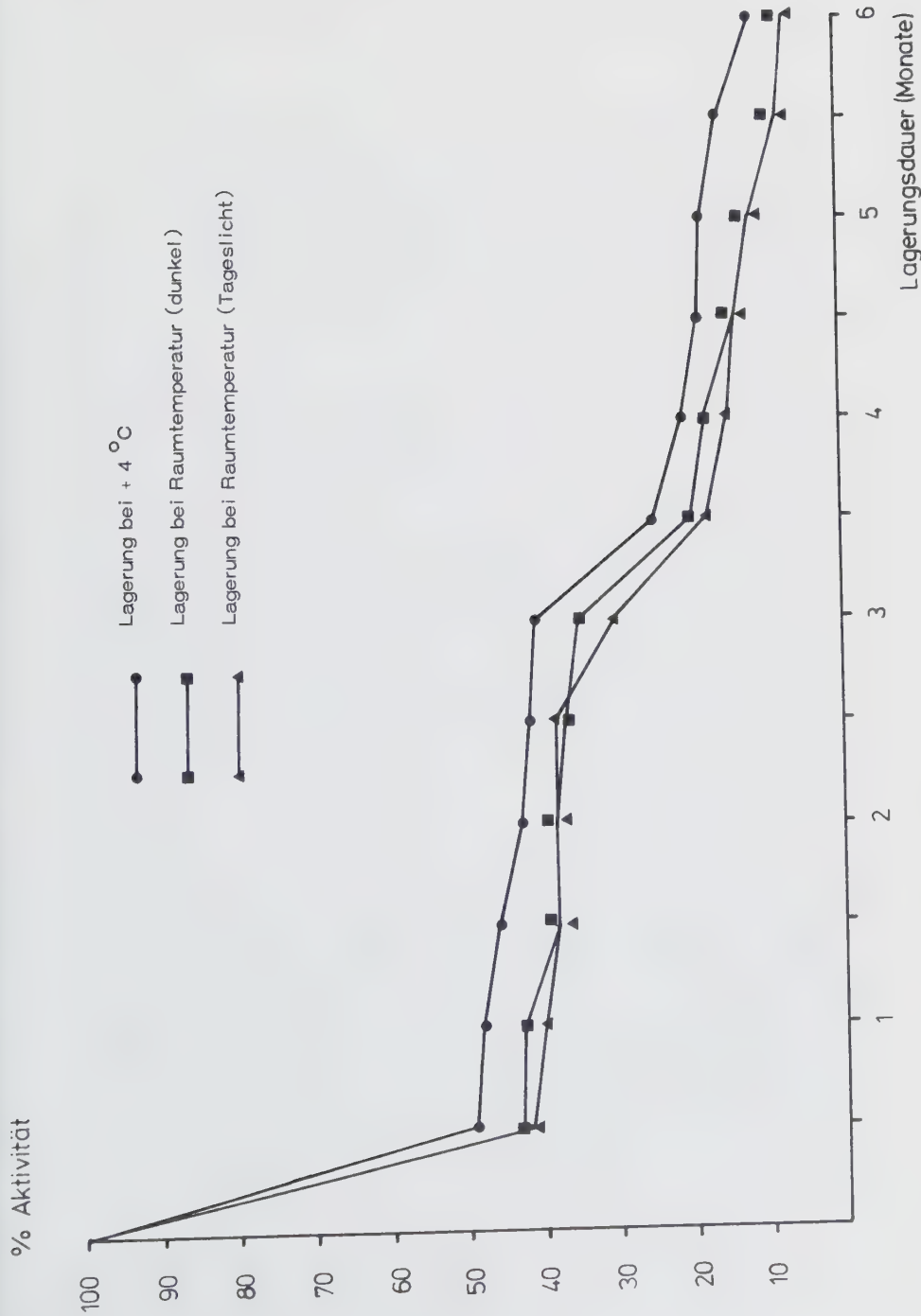


Abb. 17: Lagerung von Testplatten unter ungünstigen Bedingungen



3.6.3 Stabilität des Konjugates

3.6.3.1 Methodik

Um festzustellen, wie stark mehrmaliges Auftauen (im Brutschrank bei 37 °C) und Tiefgefrieren (auf - 20 °C) die Konjugataktivität beeinflusst, wurde unverdünntes Konjugat folgendermaßen behandelt:

Charge I (Referenz): Sofort nach der Kopplung tiefgefroren.

Charge II : 2 x ohne zwischenzeitliche Lagerung aufgetaut und wieder tiefgefroren.

Charge III : 5 x aufgetaut und wieder tiefgefroren.

Charge IV : 10 x aufgetaut und wieder tiefgefroren.

Charge V : Sofort nach der Kopplung gefriergetrocknet.

Die enzymatische Aktivität des Konjugates wurde anhand des proportionalen Substratumsatzes im ELISA ermittelt. Dazu wurden die Chargen I - IV aufgetaut bzw. Charge V in PBS-pH 7,2 gelöst und eine Arbeitsverdünnung von 1 : 400 hergestellt. AK-beschichtete Testplatten wurden zunächst mit SEC₁-Standardlösung (Konzentration: 50 pg/ml bis 1 µg/ml), dann mit den verschiedenen Konjugatchargen inkubiert und entsprechend Abschnitt 3.3.5 ausgewertet.

3.6.3.2 Ergebnisse

Die Konjugataktivität wurde durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren (- 20 °C) herabgesetzt. Während die Aktivität nach zweimaligem Auftauen und Einfrieren noch ca. 95 % der Ausgangsaktivität ausmachte, war sie nach fünf- bzw. zehnmaligem Auftauen und Einfrieren auf etwa die Hälfte abgesunken. Das gefriergetrocknete Konjugat wies eine etwa 15 % geringere Aktivität auf als das tiefgefrorene Material.

Staphylococcus aureus zählt weltweit neben Salmonellen zu den häufigsten bakteriellen Lebensmittelvergiftern. Die als Staphylokokken-Intoxikation bezeichnete Erkrankung wird durch hitzestabile Enterotoxine (SE) hervorgerufen, die von etwa 50 % (NOTERMANS et al., 1984a) der koagulase-positiven Staphylokokken gebildet werden. Die SE werden aufgrund ihrer Reaktion mit spezifischen Antikörpern (AK) in verschiedene Typen (bisher bekannt: A, B, C₁, C₂, C₃, D und E) eingeteilt. Der Nachweis der SE ist aus epidemiologischen Gründen wichtig und dient außerdem dazu, die Erfahrungen hinsichtlich der Prophylaxe der Lebensmittelvergiftungen zu erweitern. Von einem dafür geeigneten Test wird eine Nachweisesempfindlichkeit von 0,1 µg SE pro 100 g bzw. 250 ml Lebensmittel verlangt (BERGDOLL, 1979). Der konventionelle SE-Nachweis mittels Gelpräzipitationstest nach OUCHTERLONY erfordert aufgrund der verhältnismäßig geringen Sensitivität zuvor eine zeit- und arbeitsaufwendige Extraktion, Konzentrierung und Teilreinigung der SE. Von den hierfür empfohlenen Methoden hat das erstmals von CASMAN und BENNETT (1965) beschriebene, später an der Food and Drug Administration modifizierte (BENNETT und McCLURE, 1980) und unter die AOAC-Methoden aufgenommene Verfahren die weiteste Verbreitung gefunden. Da die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Art des untersuchten Lebensmittels frühestens nach 4-7 Tagen vorliegen, hat man versucht, durch Einsatz von Verfahren mit wesentlich größerer Empfindlichkeit eine Abkürzung der Extraktion zu erreichen. Von den hierfür empfohlenen Methoden - z.B. umgekehrte passive Hämagglutination, Latex-Agglutination, Radio-Immuntest (RIA), Enzym-Immuntest (EIA) - haben RIA und EIA die größte Bedeutung gewonnen. Beide Nachweissysteme beruhen im Prinzip auf dem gleichen System, doch sprechen für die von ENGVALL und PERLMANN (1971) sowie von WEEMEN und SCHUURS (1971) entwickelten enzymimmunologischen Tests einige Vorteile (s.a. Übersicht 11; Seite 23). Von diesen sind im Hinblick auf die Durchführung der Tests auch im Rahmen

von Routineuntersuchungen besonders wichtig:

- Der an gesetzliche Auflagen gebundene Umgang mit radioaktivem Material entfällt,
- es bestehen keine Probleme hinsichtlich der Abfallbeseitigung,
- eine besondere Ausbildung des Personals ist nicht erforderlich,
- die Reagenzien sind stabil und relativ preiswert,
- die notwendige Geräte-Ausstattung ist in Routinelabors i.d.R. vorhanden.

SIMON und TERPLAN (1977) beschrieben als erste einen Nachweis von SE - und zwar Typ B - in Lebensmitteln mittels einer kompetitiven Technik in Polystyrolröhrchen. In fortführenden Experimenten an diesem Institut wurde der Test optimiert und rationalisiert (z.B. Einsatz von Mikrotiterplatten, automatische Auswertung mit einem Spezialgerät - Mikro-ELISA Autoreader); außerdem wurde aufgrund von Vergleichsuntersuchungen der empfindlicheren und kostengünstigeren Sandwich-Technik der Vorzug gegeben (TERPLAN, 1982; LINZ, 1983). Auch FEY, der sich ursprünglich der kompetitiven Technik bediente (FEY und STIFFLER-ROSENBERG, 1977; FEY, 1978; STIFFLER-ROSENBERG und FEY, 1978), setzte später die Sandwich-Technik ein (FEY et al., 1982 und 1984), da diese nicht nur empfindlicher sei, sondern auch nicht die oft schwierige Herstellung großer Mengen gereinigter SE (insbesondere SED und SEE) erfordere und die Einstellung der Reaktionspartner weniger kritisch sei (FEY et al., 1982).

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein empfindliches enzymimmunologisches Verfahren nach dem Sandwich-Prinzip für den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin C₁ (SEC₁) entwickelt und auf seine Eignung zur Untersuchung von gereinigten SE-Präparationen, Kulturüberständen und Lebensmitteln geprüft werden. Bei der Aufbereitung der Lebensmittel sollte auf Extraktions- und Konzentrierungsschritte soweit als möglich verzichtet und die Auswertung des Tests durch Einsatz eines Rechners erleichtert werden.

Zur Herstellung des spezifischen Antiserums wurden Kaninchen ("Neuseeländer-Hybriden") in Anlehnung an die Methode von RICHTER und KARSCH (1980) mit nach BORJA und BERGDOLL (1967) sowie ENDE et al. (1983) gereinigtem

SEC₁ subcutan immunisiert. Dabei wurde, um die Tiere langsam an das toxische Material zu adaptieren, die Initialdosis jedoch von 5 auf 2,5 µg SEC₁ reduziert; die anderen vier im wöchentlichen Abstand applizierten Dosen (5, 20, 100 bzw. 400 µg) blieben ebenso unverändert, wie jene bei der nach einer sechswöchigen Unterbrechung erfolgten Boosterinjektion (1,7 mg). Bei vier Tieren war zwei Wochen nach der Boosterung im Objektträger-Gel-Diffusionstest (SOMMERFELD und TERPLAN, 1975) ein reziproker Präzipitationstiter von 256 nachzuweisen, bei einem Tier ein solcher von 1024 (jeweils gegenüber 7 µg SEC₁/ml). Da nach Angaben von BERGDOLL (1977) bei ähnlichen Injektionsdosen maximal Präzipitationstiter von 1 : 200 erzielt wurden und RICHTER und KARSCH (1980) von maximalen Titern von 1 : 256 berichteten, war die durchgeführte Immunisierung insgesamt sehr erfolgreich abgelaufen. Erhebliche individuelle Unterschiede in der AK-Produktion (um das Drei- bis Fünffache) sind im übrigen nach ROBBINS und BERGDOLL (1984) häufiger zu beobachten. Nachteilig bei der vorgenommenen Immunisierung war allerdings, daß relativ große Mengen an gereinigtem SEC₁ erforderlich waren (ca. 2,3 mg/Tier). Zwar haben ROBBINS und BERGDOLL (1984) aufgrund umfangreicher Experimente ein Schema entwickelt, das nur noch 420 µg SEC/Tier erfordert, doch liegen die AK-Titer bei SEC-Präparationen durchschnittlich unter 1 : 100 (maximal 1 : 145). Günstiger ist die von NOTERMANS (1982) empfohlene Immunisierung von Schafen, bei der mit ungefähr dem gleichen geringen SE-Aufwand (570 µg pro Tier) offensichtlich hohe reziproke Präzipitationstiter erreicht werden können, wie auch LOHNEIS (1984) bei SEB (1024) feststellte. Hinzu kommt, daß bei Schafen eine wesentlich höhere Serumausbeute als bei Kaninchen gegeben ist und der Anteil der mit Staphylokokken-Protein A (SPA) reagierenden Immunglobuline in den Seren von Schafen geringer als in Kaninchenserum ist (GODING, 1978; GOUDSWAARD et al., 1978; BENNELL und WATSON, 1980; LANGONE, 1982).

Für die eigenen Experimente standen jedoch keine Schafe zur Verfügung.

Zur Beschichtung der Festkörperphase (Polystyrol-Mikrotiterplatten) und zur Herstellung von Enzymkonjugaten wurde die γ -Globulinfraktion aus dem Antiserum isoliert. In vergleichenden Experimenten zeigte sich, daß die Fällung mit 35 % gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (1,4 mol/l) erheblich besser geeignet war als die konventionelle Technik mit halbgesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung. Es konnte dabei die Beobachtung von HEBERT et al. (1973) bestätigt werden, daß die Präzipitate bei der konventionellen Technik einen deutlich höheren Anteil an unerwünschtem α - bzw. β -Globulin sowie Albumin enthielten. Eine weitere Reinigung der nach der Präzipitation erhaltenen Anti-SEC₁- γ -Globulinfraktion erwies sich aufgrund von Modellexperimenten als nicht erforderlich, so daß im Hinblick auf den hierfür notwendigen Aufwand darauf verzichtet wurde.

Auch SAUNDERS und BARTLETT (1977) sowie ACKERMAN und CHESBRO (1981) waren in gleicher Weise vorgegangen.

Als Markerenzym für die Konjugatherstellung wurde Meerrettichperoxidase (HRPO) gewählt, die auch bei den meisten anderen enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von SE zur Anwendung kam (s.a. Übersicht 13; Seite 27). Das Enzym ist relativ billig, leicht an AK zu koppeln und kann verschiedene Substrate umsetzen. AK (Anti-SEC₁- γ -Globulin) und Enzym wurden nach der Methode von WILSON und NAKANE (1978) gekoppelt. Hierbei werden Kohlenhydratketten auf der Oberfläche des HRPO-Moleküls durch Natriumperjodat zu Aldehydgruppen oxidiert (s.a. Abb. 1). Diese gehen mit primären Aminogruppen des IgG-Moleküls eine kovalente Bindung in Form einer Schiff'schen Base ein, die durch anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid stabilisiert wird (WILSON und NAKANE, 1978). Das Kopplungsprodukt wurde durch Gelchromatographie (Sephacryl S-200 superfine) gereinigt, da unmarkierte AK und ungekoppeltes Enzym die Empfindlichkeit des Tests vermindern (SCHUURS und van WEEMEN, 1977). Anschließend wurden die Fraktionen mit einer sich aus dem Quotienten $E_{403 \text{ nm}} : E_{280 \text{ nm}}$ ergebenden Reinheitszahl (RZ) von 0,4 bis 0,5 gepoolt, da bei diesen Werten durchschnittlich ein bis zwei HRPO-Moleküle an ein IgG-Molekül gebunden sind und

derartige Konjugate eine hohe AK-Aktivität aufweisen sowie keine Neigung zu unspezifischen Bindungen zeigen (WILSON und NAKANE, 1978).

Nachdem die für die Durchführung des Sandwich-ELISA erforderlichen wesentlichen Reagenzien (AK, Konjugat) zur Verfügung standen, wurde mit der Entwicklung des Nachweis-Systems begonnen. Für die Herstellung des Immunsorbens wurden als Festkörperphase ähnlich wie von SAUNDERS und BARTLETT (1977), ACKERMAN und CHESBRO (1981), BÜNING-PFAUE et al. (1981), FREED et al. (1982), OLSVIK et al. (1982), LINZ (1983), NOTERMANS et al. (1983a und 1984b) und LOHNEIS (1984) Polystyrol-Mikrotiterplatten, und nicht Polystyrol-Röhrchen (KOPER et al., 1980; FEY et al., 1984) oder Polystyrol-Perlen (FEY et al., 1982 und 1984; FREED et al., 1982) eingesetzt. Dies hat den Vorteil, daß geringere Mengen an Reagenzien notwendig sind und der Testablauf durch eine Teilautomatisierung von Waschvorgängen und Auswertung beschleunigt werden kann. Da schon geringe Unterschiede in der Abmessung der einzelnen Kavitäten, eine unregelmäßige Oberfläche und mechanische Einwirkungen (z.B. Kratzer) zu Schwankungen der AK-Adsorptionsrate und damit der Meßwerte führen können, wurden nur Mikrotiterplatten mit Prü fzertifikat eingesetzt.

Die Beschichtung der Platten erfolgte mit dem durch Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Anti-SEC₁- γ -Globulin. Dabei ergab sich, daß die Antigenbindungsrate ab einer γ -Globulinkonzentration von 10 μ g/ml nur noch unwesentlich gesteigert werden konnte (Abb.3). Eine Erklärung für diese auch von SIMON (1978), LINZ (1983) und LOHNEIS (1984) beschriebene Beobachtung ist, daß die Adsorptionsrate jenseits dieser Konzentration zwar weiter zunimmt, die Anzahl der Antigenbindungsstellen aber aufgrund der Bildung mehrschichtiger Proteinlagen oder sterischer Hindernisse infolge zu dichter Molekülpackung nahezu unverändert bleibt (CANTARERO et al., 1980). Der Grad der Antikörperadsorption wurde außer von der Proteinkonzentration des AK u.a. auch vom pH-Wert der AK-Lösung sowie Inkubationszeit und -temperatur beeinflusst. Zur Prüfung des pH-Einflusses wurde der AK aufgrund der unterschiedlichen Literaturangaben zum einen in PBS-pH 7,2 (SIMON und TERPLAN,

1977; NOTERMANS et al., 1978, 1983a und 1984b; SIMON, 1978; KOPER et al., 1980; BÜNING-PFAUE et al., 1981; NOTERMANS, 1982; LINZ, 1983) und zum anderen in 0,2 mol/l Natriumcarbonat-Bicarbonatpuffer-pH 9,6 (FEY, 1978; STIFFLER-ROSENBERG und FEY, 1978; BERDAL et al., 1981; FREED et al., 1982; OLSVIK et al., 1982; FEY et al., 1984; LOHNEIS, 1984) gelöst. Bei der für die eigenen Experimente gewählten AK-Konzentrationen ($10 \mu\text{g/ml}$) war die Adsorption im neutralen Bereich wesentlich besser; ähnliches hatten SIMON (1978) und LINZ (1983) auch für SEB registriert. Auch bezüglich der für eine optimale Beschichtung erforderlichen Zeit und Temperatur wurden in der Literatur recht unterschiedliche Angaben gefunden. Von den getesteten Inkubationszeiten und -temperaturen erwies sich die 3 stündige Inkubation im Brutschrank mit anschließender Lagerung über Nacht bei 4°C als am besten (Abb. 4). Andere Bedingungen - wie sie z.B. von SIMON (1978), FREED et al. (1982) und OLSVIK et al. (1982) gewählt wurden - erbrachten um 12 % (48 h, 4°C), 15 % (18 h, 4°C), 25 % (18 h, 37°C bzw. 3 h, 4°C) oder 28 % (30 min, 37°C) niedrigere AK-Bindungsrate. Die Inkubation bei Raumtemperatur (SIMON, 1978; STIFFLER-ROSENBERG und FEY, 1978; KOPER et al., 1980; BÜNING-PFAUE et al., 1981; FREED et al., 1982; LINZ, 1983; NOTERMANS et al., 1983a und 1984b; FEY et al., 1984) wurde in die Vergleichsuntersuchungen nicht einbezogen.

Eine Vorbehandlung der Mikrotiterplatten zwecks besserer Bindung der AK erwies sich als nicht erforderlich. Während die Vorbehandlung mit BSA und in PBS gelöstem Glutaraldehyd (SAUNDERS und BARTLETT, 1977) in einer deutlich herabgesetzten AK-Bindung resultierte, erbrachte jene mit in Carbonatpuffer gelöstem Glutaraldehyd (HOWELL et al., 1981) keine signifikant höhere AK-Bindungsrate als die unvorbehandelte Kontrolle. Die Vermutung von BOENISCH (1976), daß durch die Entstehung von Polymeren des Glutaraldehyds, die sich fest an die Kunststoffoberfläche anlagern eine bessere Bindung des AK-Moleküls möglich sei, konnte somit bei den verwendeten Polystyrol-Mikrotiterplatten nicht bestätigt werden. Auf diesen zusätzlichen Arbeitsschritt wurde daher im Hinblick auf den relativ geringen Effekt verzichtet.

Eine Lagerung des Immunosorbens führte in Abhängigkeit von der Art der Lagerung ("trocken" oder "feucht") und der Lagerungstemperatur zu einer unterschiedlich schnellen Abnahme der SEC_1 -Bindungskapazität. So verloren bei -20°C "feucht" (mit in PBS oder Natriumcarbonat-Bicarbonatpuffer gelöstem Anti- SEC_1 - γ -Globulin) gelagerte Mikrotiterplatten ihre Bindungskapazität deutlich langsamer als die bei gleicher Temperatur "trocken" (ohne AK-Lösung) aufbewahrten und diese wiederum langsamer als die bei $+4^\circ\text{C}$ oder Raumtemperatur gelagerten Mikrotiterplatten (Tab. 9; Abb. 15,16,17). Die erzielten Untersuchungsergebnisse lassen erkennen, daß eine "feuchte" Lagerung der Platten von mehr als zwei Monaten bei -20°C bereits mit nicht unwesentlichen Verlusten der Bindungskapazität verbunden war. Hieraus ergaben sich zwar keine Nachteile für den qualitativen Nachweis von SEC_1 , wohl aber bei der Bestimmung von SEC_1 -Gehalten. Signifikante Unterschiede zu den mit nicht-gelagerten Platten erzielten Werten bestanden jedoch nur bei Konzentrationen im ng- und μg -Bereich (nicht aber im pg-Bereich), da auch nach Abschluß der Lagerungsversuche (16 Monate bei -20°C bzw. 6 Monate bei $+4^\circ\text{C}$ oder Raumtemperatur) noch nicht alle SEC_1 -Bindungskapazitäten verloren gegangen waren. Ein Vergleich der eigenen Resultate mit jenen anderer Untersucher stößt insofern auf Schwierigkeiten, als deren Angaben nicht zu entnehmen ist, ob sich die Werte für die Haltbarkeit der Immunosorbentien (bei -20°C : über ein Jahr - LINZ (1983) -; bei $+4^\circ\text{C}$: über ein Jahr - VOLLER et al. (1979) - bzw. bis drei Monate - OLSVIK et al. (1982) -; bei Zimmertemperatur: mindestens einen Monat - SAUNDERS und BARTLETT (1977) -) nur auf den qualitativen oder auch quantitativen Antigen-Nachweis beziehen.

Bei den Versuchen zur Absättigung der nach dem Absaugen der AK verbliebenen freien Bindungsstellen in den Kavitäten der Mikrotiterplatten stellte sich heraus, daß dieses Ziel am besten mit PBS plus $1,5 \times 10^{-5}$ mol/l BSA und zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (Taumelgerät) erreicht wurde. Eine Verlängerung der Reaktionszeit bzw. Erhöhung der BSA-Konzentration erbrachte keine günstigeren Resultate.

Nach dem Waschen mit einer Tween 20 enthaltenden Kochsalzlösung wurden die Proben in die einzelnen Kavitäten gegeben. Auf den Zusatz von Tween 20 wurde bei der Herstellung und Verdünnung von Toxin-Standardlösung, Probe oder Konjugat (SAUNDERS und BARTLETT, 1977; ACKERMAN und CHESBRO, 1981; NOTERMANS et al., 1983a und 1984b; FEY et al., 1984; LOHNEIS, 1984) verzichtet, weil die Backgroundwerte dadurch nicht weiter verringert wurden und beim Anlegen von Verdünnungsreihen aufgrund der durch das Tween bedingten Schaumbildung häufig Transferierfehler auftraten. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min (Taumelgerät) und war somit nach kürzerer Zeit abgeschlossen als bei den bisher für den Nachweis von SE beschriebenen Sandwich-Techniken, bei denen die Bebrütung 40 bis 120 min in Anspruch nahm (SAUNDERS und BARTLETT, 1977; NOTERMANS et al., 1978, 1983a und 1984b; KOPER et al., 1980; ACKERMAN und CHESBRO, 1981; BÜNING-PFAUE et al., 1981; FREED et al., 1982; NOTERMANS, 1982; OLSVIK et al., 1982; LINZ, 1983; LOHNEIS, 1984) bzw. sich über Nacht erstreckte (BERDAL et al., 1981; FREED et al., 1982; FEY et al., 1984). Eine Verlängerung der Inkubationsdauer war zwar erwartungsgemäß mit einer Steigerung der Empfindlichkeit des Tests verbunden, jedoch aufgrund ausreichender Sensitivität des entwickelten Verfahrens nicht erforderlich. Die von FEY et al. (1984) beschriebene Steigerung der Empfindlichkeit durch Verwendung eines vielfachen Volumens der Reaktionspartner (AK-Pufferlösung, Probe, Konjugat) konnte in eigenen Versuchen nicht erreicht werden. Auch FREED et al. (1982), die wie FEY et al. (1984) mit Polystyrolperlen arbeiteten, und lediglich den Einfluß unterschiedlicher Probenvolumina auf die Empfindlichkeit prüften, konnten keine deutliche Änderung der Extinktionswerte feststellen.

Die optimale Verdünnung für das durch Kopplung von Anti-SEC₁- γ -Globulin an HRPO gewonnene Konjugat (s.o.) belief sich unter den erarbeiteten Testbedingungen auf 1 : 400 (Abb. 5), die für die Reaktion mit dem in den einzelnen Kavitäten befindlichen SEC₁ wiederum auf 30 min. Da sich zeigte, daß mehrfaches Auftauen und Wiedereinfrieren die Aktivität des Konjugates

beeinträchtigt, wurde dieses in kleinere Portionen (0,2 ml) aufgeteilt und nach der Empfehlung von WILSON und NAKANE (1978) unter BSA-Zusatz bei -80°C eingelagert. Die Aufbewahrung erfolgte in Glasgefäßen, da Kunststoff zu einem langsamen Aktivitätsverlust führt (SAUNDERS und BARTLETT, 1977). Wie auch FREED et al. (1982) berichteten, konnte in Lösung befindliches Konjugat für den täglichen Bedarf bis zu zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Eine Gefriertrocknung des Konjugates führte zwar zu Aktivitätsverlusten von ca. 15 %, ist aber eine geeignete Alternative zum Tiefgefrieren, da z.B. beim Transport die Aufrechterhaltung einer geschlossenen Kühlkette nicht erforderlich ist. Nach SCHUURS und van WEEMEN (1977) war im übrigen bei 18 Monate bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. 3 Jahre bei -20°C gelagerten Lyophilisaten kein Verlust an enzymatischer und immunologischer Aktivität festzustellen, so daß auch eine ausreichende Haltbarkeit gegeben ist.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde ebenso wie von LINZ (1983) und LOHNEIS (1984) ortho-Phenylendiamin (OPD), das sich durch gute Löslichkeit sowie hohen Extinktionskoeffizienten und damit Empfindlichkeit gegenüber HRPO auszeichnet (VOLLER et al., 1979; PORSTMANN et al., 1981), als Substrat eingesetzt. Für diesen Zweck erwies sich unter Berücksichtigung der kurzen Inkubationszeit (4 min) und der Empfindlichkeit des Testsystems die Substratlösung nach GALLATI und BRODBECK (1982) der nach VOLLER et al. (1979) als deutlich überlegen (Abb. 6). Auch LOHNEIS (1984) hatte - wenn auch bei längerer Inkubationszeit (15 min) - eine derartige Feststellung treffen können.

Unter den beschriebenen Bedingungen und unter Berücksichtigung einer 2,58 fachen Standardabweichung des Leerwertes ($\bar{x} + 2,58 s$) ließen sich noch 0,05 ng SEC_1/ml PBS sicher nachweisen. Die Nachweisempfindlichkeit anderer Sandwich-Verfahren wurde bei Verwendung von Mikrotiterplatten bzw. Röhrchen mit 0,05 ng/ml (LINZ, 1983), 0,1-1 ng/ml (FEY et al., 1982), 0,15 ng/ml (LOHNEIS, 1984), 0,5 ng/ml (BERDAL et al., 1981), 1 ng/ml (NOTERMANS, 1982) und 1-10 ng/ml (NOTERMANS et al., 1978) angegeben.

Die Reaktionsspezifität des Testsystems wurde anschließend an heterologen teil- und hochgereinigten SE-Typen (Konzentration: $1 \mu\text{g/ml}$) überprüft. Dabei ergaben sich Kreuzreaktionen nur mit kommerziell vertriebenen (Serva), teilgereinigten Produkten, und zwar mit SED und weniger stark ausgeprägt mit SEE (Tab. 3). Mit den im Institut hergestellten hochgereinigten Präparaten waren dagegen keine Reaktionen festzustellen. SEB ließ sich somit auch in hoher Konzentration trotz der immer wieder diskutierten serologischen Verwandtschaft von SEB und SEC (GRUBER und WRIGHT, 1969; JOHNSON et al., 1972; BERGDOLL und ROBBINS, 1973; BERGDOLL et al., 1973; BERGDOLL, 1977; SPERO et al., 1978; SPERO und MORLOCK, 1979; LEE et al., 1980; THOMPSON et al., 1984) nicht nachweisen.

Allerdings hatten auch LEE et al. (1980) nur bei zwei von drei ihrer SEC_1 -Antiseren Kreuzreaktionen mit gereinigtem SEB beobachtet. Erwartungsgemäß kam es zu einer Reaktion von Anti- SEC_1 - γ -Globulin mit SEC_2 , doch war das Bindungsvermögen im Vergleich zu SEC_1 deutlich herabgesetzt; SEC_3 stand für die Versuche nicht zur Verfügung. Auch aus anderen Untersuchungen ist bekannt, daß die erwähnten drei Varianten von SEC i.d.R. nicht nur mit dem homologen Antiserum, sondern auch dem Antiserum der beiden heterologen Varianten reagieren (AVENA und BERGDOLL, 1967; BERGDOLL und ROBBINS, 1973; BERGDOLL et al., 1973; BERGDOLL, 1974 und 1977; LEE et al., 1980; REISER et al., 1984). Allerdings ließen sich SEC_2 -Bildner im Gel-Diffusionstest nicht immer mit Anti- SEC_1 erfassen (BERGDOLL, 1974 und 1977; LEE et al., 1980; REISER et al., 1984).

Die Kreuzreaktionen bei den teilgereinigten SED- und SEE-Präparationen sind, wie in ergänzenden Untersuchungen festgestellt werden konnte, vermutlich auf die Anwesenheit von Staphylokokken-Protein A (SPA) zurückzuführen. (Für diese Untersuchungen wurde im übrigen ein Testsystem mit nativem und enzym-konjugiertem unspezifischem Kaninchen-IgG erstellt. Dieser Sandwich-Test hatte eine Nachweisgrenze von 4 ng SPA/ml und war damit ähnlich empfindlich wie die von FEY und BURKHARD (1981) bzw. OLSVIK und BERDAL (1981) beschriebenen Tests). Es ist nämlich bekannt, daß bei Durchführung der Sand-

wich-Technik unter Verwendung nativer AK vom Kaninchen falsch-positive Resultate zu erwarten sind (NOTERMANS et al., 1978 und 1982; NOTERMANS und KOPER, 1979; KOPER et al., 1980; BERDAL et al., 1981; BÜNING-PFAUE et al., 1981; LEE und SILVERMAN, 1981; FEY, 1982; FEY et al., 1982 und 1984; FREED et al., 1982; NOTERMANS, 1982; OLSVIK et al., 1982; LINZ, 1983; NOTERMANS, 1983; LOHNEIS, 1984), bedingt durch die Bindung des von fast allen *S. aureus*-Stämmen (s. Übersicht von LANGONE (1982)) gebildeten SPA an den Fc-Teil der gegen SE produzierten Immunglobuline.

Eine Möglichkeit zur Ausschaltung der falsch-positiven Reaktionen ist die proteolytische Abspaltung des Fc-Teils durch Pepsinbehandlung von Vollserum (POULSEN und HJORT, 1980), gereinigtem IgG (KOPER et al., 1980) oder Immunglobulin (MADSEN und RODKEY, 1976). Für die eigenen Versuche wurde das letztgenannte Verfahren gewählt, da es schnell und einfach durchzuführen ist, eine vorherige Reindarstellung der IgG-Fraktion entfällt und nach MADSEN und RODKEY (1976) mindestens 90 % des gesamten Serum-IgG wiedergefunden werden. Da bei der Beschichtung der Platten kleinere Spaltprodukte mit $F(ab')_2$ -Fragmenten um Bindungsstellen konkurrieren können (BARBARA und CLARK, 1982), wurde $F(ab')_2$ durch Gelfiltration aus dem Reaktionsgemisch isoliert. Wie auch KOPER et al. (1980), FEY (1982) und NOTERMANS (1982) beschrieben, wurde die Festkörperphase bei neutralem pH (7,2) beschichtet, zumal im alkalischen Bereich nur eine ungenügende Bindung der $F(ab')_2$ -Fragmente zustande kommt (FEY, 1982; FEY et al., 1982). Da die $F(ab')_2$ -Fragmente ähnliche SE-Mengen banden wie natives IgG, blieb die Empfindlichkeit des Tests mit 50 pg SEC_{41} /ml unverändert (Abb. 12). Im Gegensatz zu dieser auch von KOPER et al. (1980), BARBARA und CLARK (1982) sowie NOTERMANS (1983) beschriebenen Beobachtung registrierten FREED et al. (1982), die allerdings bei alkalischem pH arbeiteten, eine schlechtere AG-Bindung und damit eine verminderte Empfindlichkeit. SPA erbrachte auch in der höchsten geprüften Konzentration (1 µg/ml) kein positives Ergebnis.

Es ließ sich somit bestätigen, daß die ursprünglich von NOTERMANS und KOPER

(1979) sowie KOPER et al. (1980) durchgeführte Version des Sandwich-ELISA mit $F(ab')_2$ -Fragmenten ein geeignetes Verfahren zur Ausschaltung von Interferenzen durch SPA darstellt.

Die alternativ zur Eliminierung falsch-positiver Ergebnisse empfohlenen Verfahren - Vorbehandlung der zu untersuchenden Proben mit unspezifischem Kaninchen-IgG (KOPER et al., 1980; BERDAL et al., 1981; FREED et al., 1982; FEY et al., 1984) oder mit insolubilisiertem Schweine-IgG (FEY, 1982; FEY et al., 1982) - Verwendung von spezifischem Schaf-IgG zur Beschichtung der Festkörperphase und/oder zur Herstellung des Konjugates (BÜNING-PFAUE et al., 1981; van der OUDERAA und HAAS, 1981; NOTERMANS, 1982 und 1983; NOTERMANS et al., 1982, 1983a und 1984b; LOHNEIS, 1984) - wurden in Form von Modelluntersuchungen mit unspezifischem Kaninchen- γ -Globulin (statt reinem IgG) bzw. unspezifischem Schaf-IgG (statt spezifischem Schaf-IgG) ebenfalls auf ihre Eignung geprüft. Auch in diesen Fällen gelang es, die durch SPA hervorgerufenen Störungen des Sandwich-ELISA weitestgehend oder vollständig auszuschalten (Abb. 9 und 10) und somit die Ergebnisse der obengenannten Autoren zumindest prinzipiell zu bestätigen. Zurückzuführen ist dieser Effekt zum einen auf eine Absorption des SPA an das Kaninchen-IgG bereits in der Probe, zum anderen auf die erheblich schlechtere Bindung von SPA an Schaf-IgG als an Kaninchen-IgG (LIVE und RANU, 1968; KRONVALL et al., 1970; LIND et al., 1970; KESSLER, 1976; GODING, 1978; GOUDSWAARD et al., 1978; BENNELL und WATSON, 1980; LANGONE, 1982). Letzteres kann damit zusammenhängen, daß Kaninchen-IgG zum überwiegenden Teil aus der SPA-reaktiven Subklasse IgG_2 besteht (HAMMER, 1985), während beim Schaf-IgG die nicht oder kaum SPA-bindende Subklasse IgG_1 dominiert (GODING, 1978; GOUDSWAARD et al., 1978; BENNELL und WATSON, 1980; LANGONE, 1982).

Da kein Anti-SEC $_1$ - γ -Globulin vom Schaf zur Verfügung stand und die Vorbehandlung der Probe mit Kaninchen- γ -Globulin einen zusätzlichen Arbeitsschritt darstellt, wurde der entwickelte Sandwich-ELISA für den Nachweis

von SEC₁ dahingehend modifiziert, daß die Testplatten mit Anti-SEC₁-F(ab')₂-Fragmenten beschichtet wurden. Bei der Untersuchung von Überständen nicht-enterotoxinogener bzw. enterotoxinogener *S. aureus*-Stämme wurden bei den SEC₁- und SEC₂-Bildnern positive Ergebnisse registriert. Kreuzreaktionen mit anderen Enterotoxinproduzenten bzw. den Nicht-Enterotoxinbildnern (einschließlich des zur Herstellung von SPA zur Anwendung kommenden *S. aureus*-DSM 20372) waren nicht zu verzeichnen (Abb. 13). Die Nachweisgrenze lag bei 50 pg SEC₁/ml Him-Herz-Dextrose-Bouillon (BHI) und entsprach damit jener von gereinigtem, in PBS gelöstem SEC₁. Anschließend wurden einige Lebensmittel, die z.T. mit dem Auftreten von Staphylokokken-Intoxikationen im Zusammenhang gebracht worden sind, künstlich bzw. natürlich mit SEC₁ kontaminiert und im modifizierten ELISA mit Anti-SEC₁-F(ab')₂-Fragmenten untersucht. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit dieses Testsystems, das mit 50 pg/ml um mehr als das 1.000 fache sensitiver ist als der Objektträger-Gel-Diffusionstest (Nachweisgrenze: 0,1-1 µg/ml) wurde stets auf eine Konzentrierung der Proben verzichtet. Milch wurde im Hinblick auf die in Vorversuchen erzielten Ergebnisse und die Angaben von SAUNDERS und BARTLETT (1977), FREED et al. (1982), OLSVIK et al. (1982) sowie LOHNEIS (1984) keiner Aufbereitung unterzogen, sondern direkt geprüft. Bei den festen Lebensmitteln (Hackfleisch, Kartoffelsalat mit Mayonnaise, Eier-Teigwaren, Reis, Salami) wurde ausgehend von der von READ et al. (1965) bzw. von REISER et al. (1974) beschriebenen und im wesentlichen auf einer Ausfällung unerwünschter Proteine bei pH 4,5 beruhenden Methode versucht, die Extraktionsschritte so weit wie möglich abzukürzen. Zu diesem Zweck wurden Proben vom Überstand der 20 min bei 10.000 U/min und 4 °C zentrifugierten Lebensmittelhomogenisate (Stufe I) und vom Überstand des anschließend an die erwähnte Zentrifugation auf pH 4,5 angesäuerten, zentrifugierten und dann auf pH 7,2 eingestellten Materials (Stufe II) getestet. Bei Kartoffelsalat mit Mayonnaise und Hackfleisch wurde außerdem eine zweifache Chloroformextraktion einbezogen und die dabei sich ergebende wäßrige Phase (Stufe III) im ELISA verwendet (Abb. 14). In gleicher

Weise behandelte SEC_1 -freie Lebensmittel dienten als Negativ-Kontrollen und zur Erstellung einer Standardkurve mit gereinigtem SEC_1 , um zu gewährleisten, daß die Ergebnisse nicht aufgrund einer Bindung der Reaktionspartner im ELISA durch Lebensmittelbestandteile beeinflusst wurden. Um Ungenauigkeiten zu vermeiden, die aus der graphischen Auswertung des Tests (SIMON, 1978; LOHNEIS, 1984) resultieren, wurden die quantitative Toxinbestimmung und die Berechnung der Wiederfindungsraten für die einzelnen Stufen mit einem Personal-Computer durchgeführt. Bei den Stufenkontrollen (Tab. 8) zeigte sich, daß einerseits bei Hackfleisch, Kartoffelsalat mit Mayonnaise und Salami keine gesicherten Unterschiede in den durchschnittlichen Recovery-Raten der Stufen I, II und III (soweit geprüft) bestanden, diese andererseits aber in Stufe I bei Teigwaren niedriger und bei Reis signifikant höher waren als in Stufe II. Die ausgeprägten Unterschiede in der SEC_1 -Recovery-Rate beim Reis (durchschnittlich 88 % bzw. 32 %) können darauf zurückgeführt werden, daß bei der Säurefällung zusätzlich zu den nur in relativ geringer Menge vorhandenen Lebensmittelproteinen pflanzlichen Ursprungs auch ein erheblicher Anteil des SEC_1 präzipitiert wurde und somit für den Nachweis verloren ging. Derartige Effekte, die auch NISKANEN und LINDROTH (1976) in Modellexperimenten registriert hatten, traten bei den anderen Lebensmitteln vermutlich nicht auf, weil deren Proteine protektiv wirkten und somit eine ins Gewicht fallende Ausfällung von SEC_1 verhinderten. Die überraschende Zunahme der SEC_1 -Wiedergewinnungs-Rate bei den Eier-Teigwaren (durchschnittlich 62 % in Stufe I bzw. 78 % in Stufe II) dürfte dadurch bedingt sein, daß bei der Säurefällung den SEC_1 -Nachweis markierende Lebensmittelbestandteile (evtl. Eiprotein) entfernt wurden. Die nur bei Hackfleisch und Kartoffelsalat mit Mayonnaise abschließend vorgenommene zweimalige Chloroformextraktion blieb ohne signifikante Auswirkung auf die SEC_1 -Wiedergewinnungs-Rate. Die Chloroformextraktion, die i. a. zur Entfernung des SE-Nachweis störender Bestandteile (insbesondere Fett) durchgeführt wird, war vermutlich deswegen ohne positiven Einfluß, weil die sich bereits bei der Zentrifugation des Homogenisates (bei 4 °C) an der Oberfläche bildende

kompakte Fettschicht jeweils vor Untersuchung bzw. dem nächsten Extraktionsschritt entfernt wurde. Die höchsten SEC_1 -Recovery-Raten waren mit über 90 % bei der direkten Untersuchung von Vollmilch (Stufe 0) gegeben. Erwartungsgemäß wurden geringere Wiederfindungs-Raten bei Hackfleisch (im Mittel ca. 85 %), Kartoffelsalat (im Mittel ca. 78 %) oder Salami (im Mittel ca. 64 %) erzielt. Bei Reis bzw. Eier-Teigwaren (bei denen die erwähnten Unterschiede zwischen den Extraktionsstufen bestanden) lagen die maximalen Recovery-Raten mit 88 % bzw. 78 % auch in diesem Bereich. Bei Reis und Salami waren die Recovery-Raten im übrigen bei niedriger SEC_1 -Konzentration ($0,1 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) um etwa 20 % geringer als bei Zusatz von 1 oder $10 \mu\text{g}$ pro 100 g Lebensmittel. Die von anderen Autoren ermittelten Toxin-Wiederfindungsraten liegen bei 40-100 % (SAUNDERS und BARTLETT, 1977; KAUFFMAN, 1980; BÜNING-PFAUE et al., 1981; NOTERMANS et al., 1983a und 1984b; LOHNEIS, 1984). Dabei war die Aufbereitung der Lebensmittelproben - im Vergleich zum eigenen Verfahren - ähnlich einfach (SAUNDERS und BARTLETT, 1977; LOHNEIS, 1984; NOTERMANS, 1984b) oder aufwendiger (KAUFFMAN, 1980; BÜNING-PFAUE et al., 1981; NOTERMANS, 1983a).

Die Substratumsätze toxinfreier, nach dem gleichen Verfahren hergestellter Lebensmittelextrakte sowie von H-Milch lagen im übrigen auf dem gleichen Niveau wie PBS, so daß unspezifische Reaktionen durch Lebensmittelinhaltsstoffe auszuschließen waren.

Unabhängig von der untersuchten Extraktionsstufe konnten bei allen geprüften Lebensmitteln $0,1 \mu\text{g } SEC_1/100 \text{ g}$ festes bzw. 300 ml flüssiges Lebensmittel nachgewiesen und damit die Anforderungen an ein für den Nachweis von SE in Lebensmitteln geeignetes Verfahren problemlos erfüllt werden. Außer bei Milch und Reis gelang ein Nachweis auch noch, wenn die Lebensmittel nur $0,01 \mu\text{g } SEC_1$ enthielten. Die bei dieser minimalen und für den normalen Konsumenten nicht mehr riskanten SEC_1 -Konzentration aufgetretenen negativen Resultate sind bei der Milch darauf zurückzuführen, daß deren SEC_1 -Konzentration (33 pg/ml) unterhalb der Nachweisgrenze des entwickelten Testsystems

(50 pg/ml) lag und dürften beim Reis dadurch bedingt sein, daß die schon bei 0,1 µg SEC₁ herabgesetzte Recovery-Rate nochmals weiter abgenommen hatte.

Mit dem im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel des SEC₁ entwickelten Sandwich-ELISA wurden somit die Voraussetzungen für einen schnellen und empfindlichen SE-Nachweis in Lebensmitteln geschaffen. Ausgehend von AK-beschichteten Testplatten ist der gesamte Test (einschließlich Probenaufarbeitung) innerhalb eines Vormittags durchzuführen. Durch Verwendung von schwächer verdünntem Konjugat könnte der Gesamtzeitaufwand für einen qualitativen Test (bisher 90 min) weiter reduziert werden. Das Testsystem kann, sofern geeignete Reagenzien vorhanden sind, zum Nachweis der anderen SE-Typen ausgebaut werden.

In Fortführung bisheriger Arbeiten des Instituts über den enzymimmunologischen Nachweis (ELISA) von Staphylokokken-Enterotoxin Typ B (SEB) wurde ein Sandwich-Verfahren für den Nachweis von Typ C₁ (SEC₁) entwickelt.

Nach Immunisierung von Kaninchen mit gereinigtem SEC₁ wurde ein spezifisches Antiserum gewonnen und daraus durch Ammoniumsulfatfällung die Antikörper (AK)-haltige γ -Globulinfraction separiert.

Zur Enzymmarkierung der AK wurde Meerrettichperoxidase verwendet; die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte anhand des Umsatzes von ortho-Phenylendiamin.

Nach Abstimmung der Reaktionspartner und Standardisierung der Testbedingungen stand ein Sandwich-ELISA zur Verfügung, der bei Verwendung von Anti-SEC₁- γ -Globulin-beschichteten Mikrotiterplatten einen Nachweis von 50 pg gereinigtem SEC₁/ml PBS innerhalb von 90 min erlaubte.

Kreuzreaktionen mit anderen SE-Typen wurden bei gereinigten Toxinen nicht beobachtet, wohl aber bei handelsüblichen, teilgereinigten SED- und SEE-Präparationen.

Zur Eliminierung durch Staphylokokken-Protein A (SPA) hervorgerufener falsch-positiver Reaktionen wurden verschiedene Möglichkeiten geprüft. Als gut geeignet für diesen Zweck erwies sich die Verwendung von F(ab')₂-Fragmenten aus Anti-SEC₁-Kaninchen-IgG. Es wurde gezeigt, daß SPA-Interferenzen grundsätzlich auch durch Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Schaf-IgG und gleichzeitiger Verwendung von Enzymkonjugat derselben Spezies oder durch Zusatz von unspezifischem Kaninchen- γ -Globulin zum Probenmaterial verhindert werden können. Bei Einsatz von Mikrotiterplatten, die mit Anti-SEC₁-F(ab')₂-Fragmenten beschichtet waren, wurden bei Untersuchung von Kulturüberständen enterotoxinogener bzw. nicht enterotoxinogener *S. aureus*-Stämme weder falsch-negative noch falsch-positive Ergebnisse registriert.

In Modelluntersuchungen wurden künstlich bzw. natürlich kontaminierte Lebensmittel (Hackfleisch, Rohwurst, Eier-Teigwaren, Reis, Kartoffelsalat mit Mayonnaise, Milch) untersucht. Bei Anwendung einfacher Extraktionsverfahren gelang der Nachweis von $0,1 \mu\text{g SEC}_1/100 \text{ g}$ bzw. 300 ml Lebensmittel, bei den meisten Lebensmitteln auch jener von $0,01 \mu\text{g}/100 \text{ g}$.

Abschließend wurde im Hinblick auf eine Rationalisierung des SEC_1 -Nachweises ermittelt, unter welchen Bedingungen Immunosorbens und Konjugat bis zum Gebrauch vorrätig gehalten werden können.

SUMMARY

DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS BY A SANDWICH-ELISA WITH TYPE C₁ AS MODEL

In continuing previous investigations of this institute about the detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB) by the enzyme linked immunoassay (ELISA) a sandwich-technique for the detection of type C₁ (SEC₁) was developed.

After immunization of rabbits with purified SEC₁ a specific antiserum was produced and the antibody-containing γ -globulin fraction was separated by ammoniumsulfate precipitation. Horseradish peroxidase was used for enzyme-labelling of the antibodies, the activity of the enzyme was determined with ortho-phenylendiamine as substrate. After standardization of the test conditions a sandwich-ELISA was available, which allowed the detection of 50 pg purified SEC₁/ml PBS within 90 minutes, if microtiterplates precoated with anti-SEC₁- γ -globulin were used. Cross-reactions with other SE-types (A, B, D, E) did only occur with the commercially available, partially-purified SED- and SEE-preparations.

Different methods for the elimination of false-positive reactions caused by staphylococcal protein A (SPA) were examined. The use of rabbit-IgG-F(ab')₂-fragments was very suitable for this purpose. It was demonstrated, that SPA-Interferences can basically be avoided also by taking sheep-IgG instead of rabbit-IgG for the coat and the enzyme-conjugate or by adding non-specific rabbit- γ -globulin to the samples to be examined.

Using microtiterplates coated with anti-SEC₁-F(ab')₂-fragments neither false-negative nor false-positive results were registered with culture supernatants of enterotoxinogenic and non-enterotoxinogenic *S. aureus* strains.

In model-experiments artificially and naturally contaminated foods (minced meat, fermented sausages, noodles made with eggs, rice, potatoe salad with mayonnaise, milk) were tested for SEC₁. Even with a simple extraction procedure 0,1 μ g and in most cases also 0,01 μ g SEC₁ could be detected,

examining 100 g (solid material) or 300 ml (fluid material) of food.

With regard to the rationalization it was evaluated, under which conditions immunosorbent and conjugate could be stored until use.

6 LITERATURVERZEICHNIS

ACKERMAN, J. I. und W. CHESBRO (1981):

Detection of *Staphylococcus aureus* products in foods using enzyme-linked immunosorbent assay and spectrophotometric thermonuclease assay.

J. Food Safety 3, 15 - 25

ADESIYUN, A. A. und B. USMAN (1983):

Isolation of enterotoxigenic strains of staphylococci from dogs.

Vet. Microbiol. 8, 459 - 468

ALTBOUM, Z., I. HERTMAN und S. SARID (1984):

Penicillinase plasmid-linked genetic determinants for enterotoxins B and C₁ production in *Staphylococcus aureus*.

Infect. Immun. 47, 514 - 521

AVENA, R. M. und M. S. BERGDOLL (1967):

Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361.

Biochemistry 6, 1474 - 1479

AVRAMEAS, S. und T. TERNYNCK (1969):

The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents.

Immunochemistry 6, 53 - 66

BAIRD-PARKER, A. C. (1971):

Factors affecting the production of bacterial food poisoning toxins.

J. Appl. Bact. 34, 181 - 197

BARBARA, D. J. und M. F. CLARK (1982):

A simple indirect ELISA using $F(ab')_2$ -fragments of immunoglobulin.
J. Gen. Virol. 58, 315 - 322

BECKER, G. (1984):

Zur Optimierung des Thernonuklease-Nachweises in Lebensmitteln
Vet. Med. Diss. München

BENNEL, M. A. und D. L. WATSON (1980):

The interactions of porcine and ovine serum and colostral immunoglobulins
with staphylococcal protein A.
Microbiol. Immunol. 24, 871 - 878

BENNETT, R. W. und F. McCLURE (1980):

Extraction and separation of staphylococcal enterotoxin in foods:
Collaborative study.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63, 1205 - 1210

BENNICH, H. und M. W. TURNER (1969):

The release of Fc' and pFc' fragments from human Immunoglobulin G
following enzymic digestion: A time study.
Biochem. Biophys. Acta 175, 388 - 395

BERDAL, B. P., O. OLSVIK und T. OMLAND (1981):

A sandwich ELISA method for detection of Staphylococcus aureus enterotoxins.
Acta Path. Microbiol. Scandinav. Sect. B 89, 411 - 415

BERGDOLL, M. S. (1970):

Enterotoxins.

in: MONTIE, R. C., S. KADIS und S. J. AJL:

Microbial toxins, Bd. 3 (Bacterial protein toxins), p. 265 - 326
Academic Press, New York und London

DERSELBE (1974):

Persönliche Mitteilungen.

DERSELBE (1976):

Concerning the structure of the staphylococcal enterotoxins.

in: JELJASZEWICZ, J.: Staphylococci and staphylococcal diseases,
p. 583 - 586

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

DERSELBE (1977):

Immunological aspects of staphylococcal enterotoxins.

in: CATSIMPOOLAS, N.: Immunological aspects of foods, p. 199 - 220
AVI Publishing Company, Westport

DERSELBE (1979):

Staphylococcal intoxications.

in: RIEMANN, H. und F. L. BRYAN: Food-borne infections and intoxications, 2. Aufl., p. 443 - 494

Academic Press, New York, San Francisco und London

DERSELBE (1983):

Enterotoxins.

in: EASMON, C. S. F. und G. ADLAM: Staphylococci and staphylococcal infections, Bd. II (The organism in vivo and in vitro), p. 559 - 598

Academic Press Inc., London

BERGDOLL, M. S. und R. N. ROBBINS (1973):

Characterization of types of staphylococcal enterotoxins.

J. Milk Food Technol. 36, 610 - 612

BERGDOLL, M. S. und P. M. SCHLIEVERT (1984):

Toxic-shock-syndrome toxin-one.

Am. Soc. Microbiol. News 50, 525

BERGDOLL, M. S., C. R. BORJA und R. M. AVENA (1965):

Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C.

J. Bact. 90, 1481 - 1485

BERGDOLL, M. S., J. K. CZOP und S. S. GOULD (1974a):

Enterotoxin synthesis by the staphylococci.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 236, 307 - 316

BERGDOLL, M. S., I.-Y. HUANG und E. J. SCHANTZ (1974b):

Chemistry of the staphylococcal enterotoxins.

J. Agr. Food Chem. 22, 9 - 13

BERGDOLL, M. S., C. R. BORJA, R. N. ROBBINS und K. F. WEISS
(1971):

Identification of enterotoxin E.

Infect. Immun. 4, 593 - 595

BERGDOLL, M. S., I.-Y. HUANG, F. S. CHU und C. R. BORJA (1969):

The chemistry of bacterial toxins: The staphylococcal enterotoxins.

J. van die Suid-Afrikaanse Chem. Institut 22, 99 - 105

BERGDOLL, M. S., R. F. REISER, B. A. CRASS und R. N. ROBBINS
(1981):

A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates.

Lancet, 1017 - 1021

BERGDOLL, M. S., R. N. ROBBINS, K. WEISS, C. R. BORJA,
I.-Y. HUANG und F. S. CHU (1973):

The staphylococcal enterotoxins: Similarities.

in: JELJASZEWICZ, J.: Staphylococci and staphylococcal infections.

Contributions to microbiology and immunology, 1, p. 390 - 396

S. Karger Verlag, Basel und München

BETLEY, M. J. und M. S. BERGDOLL (1981):

Staphylococcal enterotoxin type C genes not associated with extrachromosomal
DNA.

Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. (D 38), 49

BJÖRK, J., B. A. PETERSSON und J. SJÖQUIST (1972):

Some physicochemical properties of protein A from *Staphylococcus aureus*.

Eur. J. Biochem. 29, 579 - 584

BOENISCH, T. (1976):

Improved enzyme immunoassay for trace proteins.

in: PEETERS, H.: Protides of biological fluids, p. 743 - 749

Pergamon Press, N. Y.

BORJA, C. R. und M. S. BERGDOLL (1967):

Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by
Staphylococcus aureus strain 137.

Biochemistry 6, 1467 - 1473

DIESELBEN (1969):

Staphylococcal enterotoxin C. II. Some physical, immunological and
toxic properties.

Biochemistry 8, 75 - 79

BRÜCKLER, J., H. KLIMA, W. SCHAEF, D. MANZ und H. BLOBEL
(1981):

Staphylococcus aureus von Kühen mit subklinischen Euterinfektionen.

Zbl. Vet. Med. B 28, 494 - 499

BÜNING-PFAUE, H., P. TIMMERMANS und S. NOTERMANS (1981):

Einfache Methode für den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin-B
in Vanillepudding mittels ELISA-Test.

Zeitschr. f. Lebensmittelunters. u. -Forsch. 173, 351 - 355

CANTARERO, L. A., J. E. BUTLER und J. W. OSBORNE (1980):

The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their
significance in solid-phase immunoassays.

Anal. Biochem. 105, 375 - 382

CASMAN, E. P. und R. W. BENNETT (1963):

Culture medium for the production of staphylococcal enterotoxin A.

J. Bact. 86, 18 - 23

DIESELBEN (1965):

Detection of staphylococcal enterotoxin in food.

Appl. Microbiol. 13, 181 - 189

CASMAN, E. P., M. S. BERGDOLL und J. ROBINSON (1963):

Designation of staphylococcal enterotoxins.

J. Bact. 85, 715 - 716

CASMAN, E. P., R. W. BENNETT, A. E. DORSEY und J. A. ISSA (1967):

Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D.

J. Bact. 94, 1875 - 1882

CHANG, P.-C., Y. YANO, M. DIGHTON und N. DICKIE (1971):
Fractionation of staphylococcal enterotoxin C₂ by isoelectric focusing.
Can. J. Microbiol. 17, 1367 - 1372

CZOP, J. K. und M. S. BERGDOLL (1970):
Synthesis of enterotoxin by L-forms of Staphylococcus aureus.
Infect. Immun. 1, 169 - 173

DANGERFIELD, H. G. (1973):
Effect of enterotoxins after ingestion by humans.
Vortrag, Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.

DAVIES, G. E. und G. R. STARK (1970):
Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent in studying the subunit
of oligomeric proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 66, 651 - 656

DICKIE, N., Y. YANO, H. ROBERN und S. STAVRIC (1972):
On the heterogeneity of staphylococcal enterotoxin C₂.
Can. J. Microbiol. 18, 801 - 804

ENDE, I. A., G. TERPLAN, B. KICKHÖFEN und D. K. HAMMER (1983):
Chromatofocusing: A new method for purification of staphylococcal
enterotoxins B and C₁.
Appl. Environ. Microbiol. 46, 1323 - 1330

ENGVAL, E. (1980):
Enzyme immunoassay ELISA and EMIT.
Meth. Enzymol. 70, 419 - 439

ENGVAL, E. und P. PERLMANN (1971):

Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA.

In: Protides of the biological fluids. Proc. of the 19th colloquium, Brugs,
p. 553 - 556

FEY, H. (1978):

Staphylokokken-Enterotoxine in Lebensmitteln und deren Nachweis.

Chem. Rundschau 31, 6 - 9

DERSELBE (1982):

Newer concepts for the detection of staphylococcal enterotoxins by ELISA.

In: WARDLEY, R. C. und J. R. CROWTHER: The ELISA: Enzyme-linked
immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis, p. 83 - 89
Martinus Nijhof Publ., The Hague

FEY, H. und G. BURKHARD (1981):

Measurement of staphylococcal protein A and detection of protein A -
carrying Staphylococcus strains by a competitive ELISA method.

J. Immunol. Methods 47, 99 - 107

FEY, H. und G. STIFFLER-ROSENBERG (1977):

Detection of staphylococcal enterotoxin B with a new modification of the
enzyme-linked immuno assay (ELISA).

Experientia 33, 1678

FEY, H., H. PFISTER und O. RÜEGG (1984):

Comparative evaluation of different ELISA systems for the detection of
staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D.

J. Clin. Microbiol. 19, 34 - 38

FEY, H., G. STIFFLER-ROSENBERG, G. WARTENWEILER-BURKHARD,
C. MÜLLER und O. RÜEGG (1982):

Der Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen (SET).

Schweiz. Arch. Tierheilk. 124, 297 - 306

FORSGREN, A. (1968):

Protein A from *Staphylococcus aureus*.

Reaction with subunits from guinea pig γ_1 - and γ_2 -globulin.

J. Immunol. 100, 927 - 930

DERSELBE (1970):

Significance of protein A production by staphylococci.

Infect. Immun. 2, 672 - 673

FORSGREN, A. und J. SJÖQUIST (1966):

Protein A from *Staphylococcus aureus*.

I. Pseudo-immune reaction with human γ -globulin.

J. Immunol. 97, 822 - 827

FREED, R. C., M. L. EVENSON, R. F. REISER und M. S. BERGDOLL
(1982):

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal
enterotoxins in foods.

Appl. Environ. Microbiol. 44, 1349 - 1355

FUKUDA, S., H. TOKUNO, H. OGAWA, M. SASAKI, T. KISHIMOTO,
J. KAWANO, A. SHIMIZU und S. KIMURA (1984):

Enterotoxigenity of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from
dogs.

Zbl. Bakt. Hyg. A 258, 360 - 367

FUNG, D. Y. C., D. H. STEINBERG, R. D. MILLER, M. J. KURANTNICK
und T. F. MURPHY (1973):

Thermal Inactivation of staphylococcal enterotoxins B and C.

Appl. Microbiol. 26, 938 - 942

GALLATI, H. und H. BRODBECK (1982):

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der
Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und o-Phenylendiamin.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 221 - 225

GANTZE, K. (1976):

Zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin in Lebensmitteln mittels
Froschspermatest und dem vorgeschalteten Extraktionsverfahren.

Vet. Med. Diss., München

GARCIA, M. L., B. MORENO und M. S. BERGDOLL (1980):

Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain.

Appl. Environ. Microbiol. 39, 548 - 553

GODING, J. W. (1976a):

The chromic chloride method of coupling antigens to erythrocytes:

Definition of some important parameters.

J. Immunol. Methods 10, 61 - 66

DERSELBE (1976b):

Conjugation of antibodies with fluorochromes:

Modifications to the standard methods.

J. Immunol. Methods 13, 215 - 226

DERSELBE (1978):

Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent.

J. Immunol. Methods 20, 241 - 253

GÖBEL, U. (1979):

Enzym-Immuno-Assays - Grundlagen und klinische Anwendung.

Wehrmed. Mschr. 23, 354 - 360

GOUDSWAARD, J., J. A. van der DONK, A. NOORDZIJ, R. H. van DAM
und J.-P. VAERMAN (1978):

Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins.

Scandinav. J. Immunol. 8, 21 - 28

GRABAR, P. und C. A. WILLIAMS (1953):

Méthode permettant l'étude conjuguée des propriéti's électrophoréti'ques et
immunochimiques d'un mélange de protéines.

Application au serum sanguin.

Biochem. Biophys. Acta 10, 193 - 194

GRUBER, J. und G. G. WRIGHT (1969):

Ammonium sulfate coprecipitation antibody determination with purified
staphylococcal enterotoxins.

J. Bact. 99, 18 - 24

GUITIERREZ, L. M., J. MENES, M. L. GARCIA, B. MORENO und
M. S. BERGDOLL (1982):

Characterization and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from
mastitic ovine milk in Spain.

J. Food Prot. 45, 1282 - 1286

GUSS, B., M. UHLEN, B. NILSSON, M. LINDBERG, J. SJÖQUIST
und J. SJÖDAHL (1984):

Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A.
Eur. J. Biochem. 138, 413 - 420

HAJEK, V. (1976):

Staphylococcus intermedius, a new species isolated from animals.
Int. J. System. Bact. 26, 401 - 408

DERSELBE (1978):

Identification of enterotoxigenic staphylococci from sheep and sheep cheese.
Appl. Environ. Microbiol. 35, 264 - 268

HAJEK, V. und E. MARSALEK (1973):

The occurrence of enterotoxigenic Staphylococcus aureus strains in hosts of
different animal species.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 223, 63 - 68

HAMMER, D. (1985):

Persönliche Mitteilungen

HEBERT, G. A., P. L. PELHAM und B. PITTMAN (1973):

Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the
fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera.
Am. Soc. Microbiol. 25, 26 - 36

HEIMER, R., S. S. SCHNOLL und A. PRIMACK (1967):

Products of the peptic digestion of human G-immunoglobulin.
Biochemistry 6, 127 - 133

HJELM, H. (1975):

Isolation of IgG 3 from normal human sera and from a patient with multiple myeloma by using protein A - Sepharose 4 B.

Scand. J. Immunol. 4, 633 - 640

HOLBROOK, R. und A. C. BAIRD-PARKER (1975):

Serological methods for the assay of staphylococcal enterotoxins.

in: BOARD, R. G. und D. W. LOVELOCK: Some methods for microbiological assay.

Soc. App. Bact. Techn., 8, p. 107 - 128

Academic Press, London, New York und San Francisco

HOWELL, E. E., J. NASSER und K. J. SCHRAY (1981):

Coated tube enzyme immunoassay: Factors affecting sensitivity and effects of reversible protein binding to polystyrene.

J. Immunoassay 2, 205 - 225

HUANG, I.-Y., T. SHIH, C. R. BORJA, R. M. AVENA und

M. S. BERGDOLL (1967):

Amino acid composition and terminal amino acids of staphylococcal enterotoxins C.

Biochemistry 6, 1480 - 1483

IGARASHI, H., H. FUJIKAWA, H. USAMI, S. KAWABATA und

T. MORITA (1984):

Purification and characterization of Staphylococcus aureus FRI 1169 and 587 toxic-shock-syndrome enterotoxins.

Infect. Immun. 44, 175 - 181

INGANÄS, M., S. G. O. JOHANSSON und H. H. BENNICHT (1980):
Interaction of human polyclonal IgE and IgG from different species with
protein A from *Staphylococcus aureus*: Demonstration of protein A-reactive
sites located in the Fab₂-fragment of human IgG.

Scandinav. J. Immunol. 12, 23 - 31

JAMLANG, E. M., M. L. BARTLETT und H. E. SNYDER (1971):

Effect of pH, protein concentration, and ionic strength on heat
inactivation of staphylococcal enterotoxin B.

Appl. Microbiol. 22, 1034 - 1040

JANIN, F., C. LAPEYRE, M. L. de BUYSER, F. DILASSER und
M. BOREL (1984):

Purification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A, C₁, and D by
fast protein liquid chromatography (F. P. L. C.).

in: ALOUF, J. E., F. J. FEHRENBACH, J. H. FREER und

J. JELJASZEWICZ: Bacterial protein toxins, p. 251 - 252

Academic Press, London

JARVIS, A. W., R. C. LAWRENCE und G. G. PRITCHARD (1973):

Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C under conditions of
controlled pH and aeration.

Infect. Immun. 7, 847 - 854

JOHNSON, H. M., J. A. BUKOVIC und P. E. KAUFFMAN (1972):

Antigenic cross-reactivity of staphylococcal enterotoxins.

Infect. Immun. 5, 645 - 647

KAJI, Y. und E. KATO (1980):

Occurrence of enterotoxigenic staphylococci in household and laboratory dogs.

Jpn. J. Vet. Res. 28, 86 - 94

KARSCH, W. und U. RICHTER (1979):

Reinigung der Staphylokokken-Enterotoxine A - E.

Z. Ges. Hyg. 25, 613 - 615

KATO, E. und T. KUME (1980):

Enterotoxigenicity of bovine staphylococci isolated from California mastitis test-positive milk in Japan.

Jpn. J. Vet. Res. 28, 75 - 85

KATO, E., Y. KAJI und K. KANEKO (1978):

Enterotoxigenic staphylococci of canine origin.

Am. J. Vet. Res. 39, 1771 - 1773

KAUFFMAN, P. E. (1980):

Microbiological methods: Enzyme immunoassay for staphylococcal enterotoxin A.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63, 1138 - 1143

KESSLER, S. W. (1976):

Cell membrane antigen isolation with the staphylococcal protein A antibody adsorbent.

J. Immunol. 117, 1482 - 1490

KOPER, J. W., A. M. HAGENAARS und S. NOTERMANS (1980):

Prevention of cross-reactions in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of Staphylococcus aureus enterotoxin type B in culture filtrates and foods.

J. Food Safety 2, 35 - 45

KRONVALL, G. und R. C. WILLIAMS (1969):

Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups.

J. Immunol. 103, 828 - 833

KRONVALL, G., U. S. SEAL, J. FINSTAD und R. C. WILLIAMS (1970):

Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc-fragment of

γ -globulin using staphylococcal protein A.

J. Immunol. 104, 140 - 147

LACHICA, R. V., C. A. GENIGEORGIS und P. D. HOEPRICH (1979):

Occurrence of protein A in *Staphylococcus aureus* and closely related
staphylococcus species.

J. Clin. Microbiol. 10, 752 - 753

LANGONE, J. J. (1982):

Protein A of *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors
produced by streptococci and pneumococci.

in: DIXON, F. J. und H. G. KUNKEL: *Advances in immunology*, 32,
p. 157 - 252

Academic Press, New York

LEE, A. C. M., R. N. ROBBINS, R. F. REISER und M. S. BERGDOLL
(1980):

Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxins
B, C₁, and C₂.

Infect. Immun. 27, 431 - 434

LEE, R. Y. und G. J. SILVERMAN (1981):

Extracellular protein A and its influence on the assay of *Staphylococcus*
aureus enterotoxin A.

Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol., 196

LIND, I., I. LIVE und B. MANSA (1970):

Variation in staphylococcal protein A reactivity with γ -globulins of different species.

Acta Path. Microbiol. Scandinav. Sect. B 78, 673 - 682

LINZ, G. (1983):

Untersuchungen zur Rationalisierung enzymimmunologischer Nachweise von Staphylokokken-Enterotoxinen am Beispiel des Typ B.

Vet. Med. Diss. München

LIVE, I. und R. S. RANU (1968):

Serological activity of protein A of Staphylococcus aureus: The precipitinogen as an antigen for determining antibodies by the passive hemagglutination test.

J. Bact. 96, 14 - 23

LOHNEIS, M. (1984):

Der Lumineszenzimmunologische Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin B im Vergleich zum enzymimmunologischen.

Vet. Med. Diss. München

LOMBAI, G., L. JANOSI, F. KATONA, P. MAJOR, H. MILCH, L. ORMAY und J. TAKACS (1980):

Eigenschaften und lebensmittelhygienische Bedeutung von aus Eutern isolierten Staphylococcus aureus-Stämmen.

Arch. Lebensmittelhyg. 31, 206 - 209

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL (1951):

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

MACKENZIE, M. R. und N. L. WARNER (1977):

Unveröffentlichtes Manuskript.

zit. n. GODING, J. W. (1978):

Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent.

J. Immunol. Methods 20, 241 - 253

MACKENZIE, M. R., N. L. WARNER und G. F. MITCHELL (1977):

Unveröffentlichtes Manuskript.

zit. n. GODING, J. W. (1978):

Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent.

J. Immunol. Methods 20, 241 - 253

MADSEN, L. H. und L. S. RODKEY (1976):

A method for preparing IgG F(ab')₂-fragments using small amounts of serum.

J. Immunol. Methods 9, 355 - 361

MAYER, S. (1975):

Enterotoxinbildungsvermögen boviner und humaner Staphylokokken unter Berücksichtigung der Antibiotikaresistenz und anderer biologischer Eigenschaften.

Vet. Med. Diss. München

MENES, J., M. L. GARCIA, B. MORENO, L. GUITIERREZ und

J. J. F. POLLEDO (1984):

Staphylococci isolated from abscesses in slaughtered animals:

Characterization and epidemiological studies.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 178, 551 - 561

METZGER, J. F., A. D. JOHNSON und L. SPERO (1975):

Intrinsic and chemically produced microheterogeneity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type C.

Infect. Immun. 12, 93 - 97

MEYER, G., J. HINTERBERGER und R. KORTE (1977):

Detoxifizierung von Staphylokokken-Enterotoxin B im Wasser.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 164, 352 - 359

MEYER, R. F., L. MILLER, R. W. BENNETT und J. D. MACMILLAN (1984):

Development of a monoclonal antibody capable of interacting with five serotypes of *Staphylococcus aureus* enterotoxin.

Appl. Environ. Microbiol. 47, 283 - 287

MEYER, W., H. RISCHE und W. WITTE (1978):

Epidemiologische Überwachung von *Staphylococcus aureus*.

Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie 24, 1 - 123

MINOR, T. E. und E. H. MARTH (1976):

Staphylococci and their significance in foods.

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford und New York

MORITA, T. N. und M. J. WOODBURN (1978):

Homogeneous enzyme immuno assay for staphylococcal enterotoxin B.

Infect. Immun. 21, 666 - 668

MORITA, T. N., J. E. PATTERSON und M. J. WOODBURN (1979):

Magnesium and iron addition to casein hydrolysate medium for production of staphylococcal enterotoxin A, B, and C.

Appl. Environ. Microbiol. 38, 39 - 42

NISKANEN, A. und L. KOIRANEN (1977):

Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources.

J. Food Prot. 40, 543 - 547

NISKANEN, A. und S. LINDROTH (1976):

Comparison of different purification procedures for extraction of staphylococcal enterotoxin A from foods.

Appl. Environ. Microbiol. 32, 455 - 464

NOTERMANS, S. (1982):

Detection of staphylococcal enterotoxins (SE) with special reference to the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

In: CORRY, J. E. L., D. ROBERTS und F. A. SKINNER: Isolation and identification methods for food poisoning outbreaks, p. 199 - 209
Academic Press, London

DERSELBE (1983):

Nachweis von Staphylokokkus-Enterotoxinen in Lebensmitteln mittels ELISA-Test.

Deutsche Lebensmittel-Rundschau 79, 156 - 159

DERSELBE (1984):

Enzyme-linked immunosorbent assay of staphylococcal enterotoxins in foods.

Unveröffentlichtes Manuskript

NOTERMANS, S. und J. B. DUFRENNE (1982):

A simple purification method for enterotoxin F produced by Staphylococcus aureus and some properties of the toxin.

Antonie van Leeuwenhoek 48, 447 - 455

NOTERMANS, S. und J. W. KOPER (1979):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of
Staphylococcus aureus enterotoxin.

Antonie van Leeuwenhoek 45, 625

NOTERMANS, S., P. TIMMERMAN und J. NAGEL (1982):

Interaction of staphylococcal protein A in enzyme-linked immunosorbent
assays for detecting staphylococcal antigens.

J. Immunol. Methods 55, 35 - 41

NOTERMANS, S., P. TIPS und K. J. HENVELMAN (1984a):

Einfluß der Milieu-Bedingungen auf das Wachstum von S. aureus
und die Enterotoxin-Bildung.

Fleischwirtsch. 64, 1490 - 1496

NOTERMANS, S., R. BOOT, H. HAAS und R. A. DRIEDONKS (1984b):

Relation between immunological and biological activity of Staphylococcus
aureus enterotoxin A in food upon different treatment.

Unveröffentlichtes Manuskript

NOTERMANS, S., R. BOOT, P. D. TIPS und M. P. DE NOOIJ (1983a):

Extraction of staphylococcal enterotoxins (SE) from minced meat and
subsequent detection of SE with enzyme-linked-immunosorbent assay
(ELISA).

J. Food Prot. 46, 238 - 241

NOTERMANS, S., W. J. van LEEUWEN, J. DUFRENNE und P. D. TIPS
(1983b):

Serum antibodies to enterotoxins produced by Staphylococcus aureus
with special reference to enterotoxin F and toxic shock syndrome.

J. Clin. Microbiol. 18, 1055 - 1060

NOTERMANS, S., H. L. VERJANS, K. BOL und M. van SCHOTHORST
(1978):

Enzyme-linked-immuno assay (ELISA) for determination of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type B.

Health Lab. Sci. 15, 28 - 31

ODA, T. (1978):

Application of SP-sephadex chromatography to the purification of staphylococcal enterotoxins A, B, and C₂.

Jpn. J. Bact. 33, 743 - 752

OLSVIK, O. und B. P. BERDAL (1981):

A sensitive ELISA method for protein A detection.

Acta Path. Microbiol. Scandinav. Sect. B 89, 289 - 290

OLSVIK, O., S. MYHRE, B. P. BERDAL und K. FOSSUM (1982):

Detection of staphylococcal enterotoxin A, B, and C in milk by an ELISA procedure.

Acta Vet. Scandinav. 23, 204 - 210

OUCHTERLONY, Ö. (1948):

Antigen-antibody reactions in gels.

Arch. Kemi. Min. Geol. 26, B, 1

zit. n. SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):

Methoden zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128 - 137

van der OUDERAA, F. und H. HAAS (1981):

Use of immunoassays to detect enterotoxin B of *Staphylococcus aureus* in foods.

Antonie van Leeuwenhoek 47, 186 - 187

PATEL, P. D. und P. A. GIBBS (1984):

Development of an inhibition magnetic enzyme-immuno assay (MEIA) technique for determination of staphylococcal enterotoxin B.

Biochem. Soc. Transactions 12, 264 - 265

PORSTMANN, B., T. PORSTMANN und E. NUGEL (1981):

Comparison of chromogens for the determination of horseradish peroxidase as a marker in enzyme immuno assay.

J. Clin. Chem. Biochem. 19, 435 - 439

POULSEN, F. und T. HJORT (1980):

A simple method for the production of Fab preparations by pepsin digestion of total serum protein.

Acta Path. Microbiol. Scandinav. Sect. C 88, 241 - 245

READ, R. B. und J. G. BRADSHAW (1966):

Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B in veronal buffer.

Appl. Microbiol. 14, 130 - 132

READ, R. B., J. BRADSHAW, W. L. PRITCHARD und L. A. BLACK (1965):

Assay of staphylococcal enterotoxin from cheese.

J. Dairy Sci. 48, 420 - 424

REISER, R. F. und M. S. BERGDOLL (1979):

Unveröffentlichte Ergebnisse.

zit. n. BERGDOLL, M. S. (1983):

Enterotoxins.

in: EASMON, C. S. F. und G. ADLAM: Staphylococci and staphylococcal infections, Bd. II (The organism in vivo and in vitro), p. 579 - 598

Academic Press, London

REISER, R. F. und K. F. WEISS (1969):

Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C in various media.

Appl. Microbiol. 18, 1041 - 1943

REISER, R., D. CONWAY und M. S. BERGDOLL (1974):

Detection of staphylococcal enterotoxins in foods.

Appl. Microbiol. 27, 83 - 85

REISER, R. F., R. N. ROBBINS, G. P. KHOE und M. S. BERGDOLL
(1983):

Purification and some physicochemical properties of toxic-shock toxin.

Biochem. 22, 3907 - 3912

REISER, R. F., R. N. ROBBINS, A. L. NOLETO, G. P. KHOE und
M. S. BERGDOLL (1984):

Identification, purification, and some physicochemical properties of
staphylococcal enterotoxin C₃.

Infect. Immun. 45, 625 - 630

RICHTER, U. und W. KARSCH (1980):

Herstellung diagnostischer Antiseren zum Nachweis der Staphylokokken-
Enterotoxine A - E.

Z. Ges. Hyg. 26, 53 - 55

RICHTER, U., W. WITTE, W. KARSCH und R. HUMMEL (1977):

Standortvarietät und Enterotoxinbildung von *Staphylococcus aureus*-
Stämmen aus Materialien von Menschen, Rindern und Schafen.

Z. Ges. Hyg. 23, 913 - 917

ROBERN, H., S. STAVRIC und N. DICKIE (1975):

The application of QAE-sephadex for the purification of two staphylococcal enterotoxins.

Biochim. Biophys. Acta 393, 148 - 158

ROBBINS, R. N. und M. S. BERGDOLL (1984):

Production of rabbit antisera to the staphylococcal enterotoxins.

J. Food Prot. 47, 172 - 176

ROBBINS, R. N., S. GOULD und M. S. BERGDOLL (1974):

Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains.

Appl. Microbiol. 28, 946 - 950

SALTVEDT, E. und M. HARBOE (1976):

Binding of IgA to protein A-containing staphylococci: Relationship to subclasses.

Scandinav. J. Immunol. 5, 1103 - 1108

SAUNDERS, G. C. (1974):

Serologic testing with enzyme-labelled antibodies (ELA).

Proc. 17th Ann. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnost., Roanoke/Virginia,
Oct. 13 - 15, 311 - 320

SAUNDERS, G. C. und M. L. BARTLETT (1977):

Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A.

Appl. Environ. Microbiol. 34, 518 - 521

SCHANTZ, E. J., W. G. ROESSLER, J. WAGMAN, L. SPERO,
D. A. DUNNERY und M. S. BERGDOLL (1965):

Purification of staphylococcal enterotoxin B.

Biochemistry 4, 1011 - 1016

SCHANTZ, E. J., W. G. ROESSLER, M. G. WOODBURN, J. M. LYNCH,
H. M. JACOBY, S. J. SILVERMAN, J. C. GORMAN und L. SPERO (1972):

Purification and some chemical and physical properties of staphylococcal
enterotoxin A.

Biochemistry 11, 360 - 366

SCHEGGER, G. L. A. (1978):

Zum Abtrennen und Einengen von Staphylokokken-Enterotoxin B aus
Lebensmitteln mit Hilfe der Ultrafiltration.

Vet. Med. Diss. München

SCHEUBER, P. H., H. MOSSMANN, G. BECK und D. K. HAMMER
(1983):

Direct skin test in highly sensitized guinea pigs for rapid and sensitive
determination of staphylococcal enterotoxin B.

Appl. Environ. Microbiol. 46, 1351 - 1356

SCHMIDT, J. J. und L. SPERO (1983):

The complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin C₁.

J. Biol. Chem. 258, 6300 - 6302

SCHUURS, A. H. W. M. und B. K. van WEEMEN (1977):

Enzyme-immunoassay.

Clin. Chim. Acta 81, 1 - 40

DIESELBEN (1980):

Enzyme-immunoassay: A powerful analytical tool.

J. Immunoassay 1, 229 - 249

SHINAGAWA, K., N. KUNITA und G. SAKAGUCHI (1975):

Simplified methods for purification of staphylococcal enterotoxins A and C and preparation of anti-enterotoxin sera.

Jpn. J. Bact. 30, 683 - 692

SIMON, E. (1978):

Verfahren zum schnellen und empfindlichen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin in Lebensmitteln am Modell des Enterotoxins B nach dem ELISA-Prinzip.

Vet. Med. Diss. München

SIMON, E. und G. TERPLAN (1977):

Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin B mittels ELISA-Test.

Zbl. Vet. Med. B 24, 842 - 844

SJÖDAHL, J. (1977a):

Structural studies on the four repetitive Fc-binding regions in protein A from *Staphylococcus aureus*.

Eur. J. Biochem. 78, 471 - 490

DERSELBE (1977b):

Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*.

Eur. J. Biochem. 73, 343 - 351

SJÖQUIST, J., J. MOVITZ, I.-B. JOHANSSON und H. HJELM (1972):

Localisation of protein A in the bacteria.

Eur. J. Biochem. 30, 190 - 194

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):

Methoden zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128 - 137

SPERO, L. und B. A. MORLOCK (1978):

Biological activities of the peptides of staphylococcal enterotoxin C formed by limited tryptic hydrolysis.

J. Biol. Chem. 253, 8787 - 8791

DIESELBEN (1979):

Cross-reactions between tryptic polypeptides of staphylococcal enterotoxins B and C.

J. Immunol. 122, 1285 - 1289

SPERO, L., B. A. MORLOCK und J. F. METZGER (1978):

On the cross-reactivity of staphylococcal enterotoxins A, B, and C.

J. Immunol. 120, 86 - 89

SPERO, L., R. WARREN und J. F. METZGER (1973):

Effect of single peptide bond scission by trypsin on the structure and activity of staphylococcal enterotoxin B.

J. Biol. Chem. 248, 7289 - 7294

SPERO, L., B. Y. GRIFFIN, J. L. MIDDLEBROOK und J. F. METZGER (1976):

Effect of single and double peptide bond scission by trypsin on the structure and activity of staphylococcal enterotoxin C.

J. Biol. Chem. 251, 5580 - 5588

STAVRIC, S., H. ROBERN und N. DICKIE (1975):

Microheterogeneity of staphylococcal enterotoxin C₂.

Experientia 31, 145 - 147

STENWORTH, D. R. und M. W. TURNER (1979):

Immunochemical analysis of immunoglobulins and their sub-units.

in: WEIR, D. M.: Handbook of immunological methods 1979, p. 1 - 90

Blackwell, Oxford

STEWART, G. A., R. VARRO und D. R. STANWORTH (1978):

The influence of enzymatic cleavage and chemical modification of human and rabbit IgG on their reactivity with staphylococcal protein A.

Immunology 35, 785 - 791

STIFFLER-ROSENBERG, G und H. FEY (1978):

Simple assay for staphylococcal enterotoxins A, B, and C: Modification of enzyme-linked immunosorbent assay.

J. Clin. Microbiol. 8, 473 - 479

SURGALLA, M. J., M. S. BERGDOLL und G. M. DACK (1953):

Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey-feeding test.

J. Lab. Clin. Med. 41, 782 - 788

TATINI, S. R., B. CORDS, L. L. MACKAY und R. W. BENNETT (1971):

Effect of growth temperatures higher than optimal on production of staphylococcal enterotoxins and deoxyribonuclease.

Bact. Proc. (A 101), 17

TERPLAN, G. (1982):

Unveröffentlichte Mitteilung.

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1981):

Inaktivierung von Staphylokokken-Enterotoxinen.

Unveröffentlichtes Manuskript

THOMPSON, N. E., M. J. KETTERHAGEN und M. S. BERGDOLL (1984):

Monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxins B and C:

Cross-reactivity and localization of epitopes on tryptic fragments.

Infect. Immun. 45, 281 - 285

VANDENBOSCH, L. L., D. Y.-C. FUNG und M. WIDOMSKI (1973):

Optimum temperature for enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* S-6 and 137 in liquid medium.

Appl. Microbiol. 25, 498 - 500

VOLLER, A., D. E. BIDWELL und A. BARTLETT (1979):

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Nuffield Laboratories of Comparative Medicine, The Zoological Society of London

WARREN, J. R., L. SPERO, J. F. METZGER und V. G. McGANN (1975):

Immunogenicity of formaldehyd-inactivated enterotoxins A and C₁ of *Staphylococcus aureus*.

J. Infect. Diseases 131, 535 - 542

van WEEMEN, B. K. und A. H. W. M. SCHUURS (1971):

Immunoassay using antigen-enzyme conjugates.

FEBS Letters 15, 232 - 235

WENZEL, K. (1981):

Zur Inaktivierung von Staphylokokken-Rohenterotoxinen durch einige Desinfektionsmittel.

Vet. Med. Diss. München

WILSON, M. B. und P. NAKANE (1978):

Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies.

in: KNAPP, W. et al. (1978): Immunofluorescent and related staining techniques, p. 215 - 224

Biomedical Press, Elsevier, North Holland

WOODBURN, M., T. N. MORITA und S. Z. VENN (1973):

Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C in colloidal dispersions.

Appl. Microbiol. 25, 825 - 833

YALOW, R. S. und S. A. BERSON (1959):

Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.

Nature 184, 1648 - 1649

YOTIS, W. W., N. CATSIMPOOLAS, M. S. BERGDOLL und
E. J. SCHANTZ (1974):

Scanning density gradient isoelectric focusing of Staphylococcus aureus enterotoxins B and C₁.

Infect. Immun. 9, 974 - 976

ZAADHOF, K.-J. (1978a):

Der Thermonukleasetest - Verfahren zum Nachweis der Staphylokokkenvermehrung in Lebensmitteln.

Arch. Lebensmittelhyg. 29, 138

DERSELBE (1978b):

Gegenwärtiger Stand des Nachweises von Staphylokokken-Enterotoxinen in Milch und Milchprodukten.

19. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Garmisch-Partenkirchen

ZAADHOF, K.-J. und G. TERPLAN (1983):

Inaktivierung von Staphylokokken-Enterotoxinen - ein Überblick.

Wehrmed. Mschr. 27, 467 - 473

Herrn Professor Dr. G. Terplan möchte ich abschließend für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung danken.

Besonders danke ich Herrn Dr. K.-J. Zaadhof für seine stete Hilfsbereitschaft und Beratung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Frau Bauer danke ich für das Schreiben der Arbeit, Frau Hill für die Anfertigung der Zeichnungen.

Lebenslauf

Name:	Hermann Schreiner
Geburtsdatum:	20.06.1953
Geburtsort:	Augsburg
Eltern:	Erna Schreiner, geb. Irzinger Adolf Schreiner
1959 - 1964	Volksschule Pöttmes
1964 - 1973	Descartes-Gymnasium Neuburg/Donau
Mai 1973	Abitur
1973 - 1975	Ableistung des Wehrdienstes
1976 - 1982	Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
Mai 1982	Staatsexamen
September 1982	Approbation als Tierarzt
1982 - 1985	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

